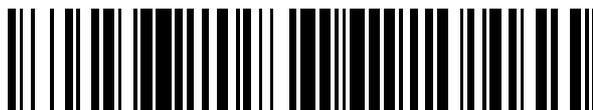


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 778**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2004** **E 11170255 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016** **EP 2407485**

54 Título: **Anticuerpos anti-IgE de humano de alta afinidad**

30 Prioridad:

01.02.2003 US 444229 P

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

15.04.2016

73 Titular/es:

TANOX, INC. (100.0%)
10301 Stella Link Road
Houston, TX 77025, US

72 Inventor/es:

FOSTER, CATHERINE;
SINGH, SANJAYA y
WU, HERREN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 566 778 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IgE de humano de alta afinidad

Antecedentes de la invención

5 La alergia es un estado hipersensible inducido por una respuesta inmunitaria exagerada a un agente extraño, tal como un alérgeno. La hipersensibilidad inmediata (tipo I), caracterizada por reacciones alérgicas inmediatamente después de entrar en contacto con el alérgeno, está mediada por los linfocitos B y se basa en reacciones entre anticuerpos y antígenos. La hipersensibilidad retardada está mediada por los linfocitos T y se basa en los mecanismos de la inmunidad celular. En los últimos años, el término «alergia» se ha convertido cada vez más en sinónima de la hipersensibilidad de tipo I.

10 La hipersensibilidad inmediata es una respuesta que se basa en la producción de anticuerpos de la clase E de las inmunoglobulinas (anticuerpos IgE) desde los linfocitos B que, tras la exposición a un alérgeno, se diferencian en células plasmáticas que secretan anticuerpos. La reacción inducida por la IgE es un acontecimiento local que se produce en el sitio por donde entra el alérgeno en el cuerpo, a saber, en la superficie de las mucosas y/o en los ganglios linfáticos locales. La IgE producida de forma local sensibilizará primero a los mastocitos locales, esto es, los anticuerpos IgE se fijan a través de su región constante a los receptores Fcε (FcεR) de la superficie de los mastocitos y a continuación «se derraman» cuando la IgE entra en el torrente sanguíneo y se fija a los receptores tanto de los basófilos en circulación como de los mastocitos fijados al tejido por todo el cuerpo. Cuando la IgE fijada se pone en contacto posteriormente con el alérgeno, los receptores Fcε se entrecruzan por la fijación del alérgeno, lo que hace que las células se desgranulen y liberen numerosos mediadores anafilácticos, tales como histamina, prostaglandinas, leucotrienos, etc. La liberación de estas sustancias es la que provoca los síntomas clínicos típicos de la hipersensibilidad inmediata, a saber, la contracción del músculo liso de las vías respiratorias o del intestino, la dilatación de los vasos sanguíneos pequeños y el incremento en su permeabilidad al agua y a las proteínas plasmáticas, la secreción de mucosidad que conduce a, p. ej., rinitis alérgica, eccema atópico y asma, y la estimulación de las terminaciones nerviosas de la piel que tiene por resultado prurito y dolor. Además, la reacción se intensifica tras el segundo contacto con el alérgeno porque algunos linfocitos B forman una «reserva de memoria» de linfocitos B que expresan la IgE en la superficie (linfocitos B sIgE⁺) después del primer contacto con el alérgeno al expresar la IgE en la superficie celular.

Hay dos receptores principales para la IgE, el receptor de alta afinidad FcεRI y el receptor de baja afinidad FcεRII. El FcεRI se expresa predominantemente en la superficie de los mastocitos y de los basófilos, pero también se encuentra el FcεRI en muy poca cantidad en los humanos sobre las células de Langerhans, las células dendríticas y los monocitos, donde intervienen en la presentación del alérgeno mediada por IgE. Además, el FcεRI se ha descrito en los eosinófilos y en las plaquetas de humano (Hasegawa, S. et al., *Hematopoiesis*, 1999, 93: 2543-2551). El FcεRI no se encuentra en la superficie de los linfocitos B ni de los linfocitos T ni de los neutrófilos. La expresión del FcεRI en la superficie de las células de Langerhans y de las células dendríticas dérmicas es importante desde los puntos de vista funcional y biológico para la presentación del antígeno fijado a IgE en los individuos alérgicos (Klupal R. et al., *J. Invest. Dermatol.* 1997, 108 (3): 336-42).

El receptor de baja afinidad, FcεRII (CD23) es una molécula de tipo lectina que comprende tres subunidades idénticas con estructuras de cabeza que se extienden desde un largo tallo en hélice α desde la membrana plasmática celular (Dierks, A. E. et al., *J. Immunol.* 1993, 150: 2372-2382). Tras la fijación a la IgE, el FcεRII se asocia al CD21 de los linfocitos B implicados en la regulación de la síntesis de la IgE (Sanon, A. et al., *J. Allergy Clin. Immunol.* 1990, 86: 333-344, Bonnefoy, J. et al., *Eur. Resp. J.* 1996, 9: 63s-66s). El FcεRII hace tiempo que se sabe que interviene en la presentación del alérgeno (Sutton y Gould, 1993, *Nature*, 366: 421-428). La IgE fijada al FcεRII de las células epiteliales es responsable de la presentación específica y rápida del alérgeno (Yang, P. P., *J. Clin. Invest.*, 2000, 106: 879-886). El FcεRII está presente en varios tipos de células, entre ellos linfocitos B, eosinófilos, plaquetas, linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T, células dendríticas foliculares y células de Langerhans.

También se han identificado las entidades estructurales de la molécula de IgE que interaccionan con el FcεRI y el FcεRII. Los estudios de mutagénesis han indicado que el dominio CH3 interviene en la interacción de la IgE tanto con el FcεRI (Presta et al., *J. Biol. Chem.* 1994, 269: 26368-26373; Henry A. J. et al., *Biochemistry*, 1997, 36: 15568-15578) como con el FcεRII (Sutton y Gould, *Nature*, 1993, 366: 421-428; Shi, J. et al., *Biochemistry*, 1997, 36: 2112-2122). Los sitios de fijación para los receptores de alta y baja afinidad se localizan simétricamente a lo largo de un eje rotacional central que atraviesa los dos dominios CH3. El sitio de fijación al FcεRI está localizado en un dominio CH3 del lado externo, cerca de la unión del dominio CH2, mientras que el sitio de fijación al FcεRII está en el extremo carboxilo de CH3.

Un concepto prometedor para el tratamiento de la alergia implica la aplicación de anticuerpos monoclonales, que son específicos del isotipo IgE y, por lo tanto, son capaces de fijarse a las IgE. Esta estrategia está basada en la

inhibición de las reacciones alérgicas por disminución de la respuesta inmunitaria mediada por IgE, que es el primer acontecimiento de la inducción de la alergia y hace posible el mantenimiento del estado alérgico. Como la respuesta de otras clases de anticuerpos no está afectada, se consigue tanto un efecto inmediato como un efecto duradero de los síntomas alérgicos. Los primeros estudios de la densidad de basófilos humanos mostraron una correlación entre la cantidad de IgE en el plasma de un paciente y el número de receptores FcεRI por basófilo (Malveaux et al., *J. Clin. Invest.* 1978, 62: 176). Observaron que la densidad del FcεRI en las personas alérgicas y no alérgicas oscilaba de 10^4 a 10^6 receptores por basófilo. Más tarde se mostró que el tratamiento de las enfermedades alérgicas con anti-IgE disminuía la cantidad de IgE en circulación al 1% de la cantidad que había antes del tratamiento (MacGlashan et al., *J. Immunol.* 1997, 158: 1438-1445). MacGlashan analizó el suero obtenido de pacientes tratados con anticuerpo anti-IgE completo, que se fija a la IgE libre en circulación en el suero del paciente. Describieron que la disminución de la cantidad de IgE en circulación en un paciente daba lugar a la presencia de un menor número de receptores en la superficie de los basófilos. Así pues, propusieron que la densidad de FcεRI sobre la superficie de los basófilos y de los mastocitos está regulada directa o indirectamente por la cantidad de anticuerpo IgE en circulación.

Más recientemente, la solicitud de patente internacional WO 99/62550 describía el uso de moléculas y fragmentos de IgE que se fijan a los sitios de fijación que FcεRI y FcεRII tienen para la IgE, con lo que bloquean la fijación de las IgE a estos receptores. Sin embargo, hay pocos tratamientos eficaces que carezcan de los efectos secundarios perjudiciales con los que abordar estas enfermedades alérgicas. Una estrategia terapéutica para tratar las enfermedades alérgicas implicaba el uso de anticuerpo humanizado anti-IgE para tratar la rinitis alérgica y el asma (Corne, J. et al., *J. Clin. Invest.* 1997, 99: 879-887; Racine-Poon, A. et al., *Clin. Pharmacol. Ther.* 1997, 62: 675-690; Fahy, J. V. et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 1997, 155: 1824-1834; Boulet, L. P. et al., *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 1997, 155: 1835-1840; Milgrom, E. et al., *N. Engl. J. Med.*, 1999, 341: 1966-1973). Estos datos clínicos muestran que la inhibición de la fijación de IgE a sus receptores es una estrategia eficaz para tratar las enfermedades alérgicas.

Kolbinger et al., *Protein Engineering* 1993, 6, n.º 8, 971-980 y la patente de los EE. UU. US 5.958.708 describen anticuerpos humanizados obtenidos mediante la humanización del anticuerpo murino anti-IgE TES-C21.

Los anticuerpos idóneos como agentes antialérgicos deben reaccionar con los linfocitos B que expresan la IgE en la superficie que se diferencian en células plasmáticas que producen IgE, por lo que se pueden utilizar para eliminar funcionalmente estos linfocitos B. Sin embargo, los anticuerpos contra la IgE también podrían inducir, en principio, la liberación de mediadores desde los mastocitos sensibilizados con IgE debido a la fijación cruzada entre los receptores Fcε, de manera que antagoniza con el efecto beneficioso ejercido sobre la cantidad de linfocitos B sIgE⁺ e IgE en el suero. Así pues, los anticuerpos aplicables para el tratamiento de la alergia no deben ser capaces de reaccionar con la IgE que se fija en los mastocitos y los basófilos sensibilizados, sino que deben conservar la capacidad de reconocimiento de los linfocitos B sIgE⁺.

Tales anticuerpos específicos del isotipo IgE han sido descritos, p. ej., por Chang et al. (*Biotechnology* 8, 122-126 (1990)), en la patente europea n.º EP 0407392 y en varias patentes de los EE. UU., p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5.449.760. Sin embargo, como los anticuerpos descritos no son de origen humano, son menos idóneos para la aplicación a los humanos debido a su capacidad inmunógena al ser proteínas extrañas. Este inconveniente se podría reducir posiblemente mediante la transformación de, p. ej., un anticuerpo monoclonal de roedor anti-IgE en un anticuerpo quimérico que combina los dominios variables del anticuerpo de roedor con los dominios constantes del anticuerpo de humano. Esta estrategia conserva el sitio de fijación al antígeno que tiene el anticuerpo anti-IgE original del roedor al mismo tiempo que confiere el isotipo y las funciones efectoras del anticuerpo humano. La inmunogenia de un anticuerpo quimérico se puede reducir más mediante la inserción de regiones hipervariables de roedor, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR, por su nombre en inglés), en las regiones flanqueantes de los dominios de la región variable de las cadenas ligera y pesada de humano que dan lugar a anticuerpos humanos remodelados. La técnica implica la sustitución o la inserción recombinantes de las secuencias CDR de roedor específicas del antígeno en lugar de las existentes dentro de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada de humano «genéricas» (patente de los EE. UU. n.º 6.180.370).

Las inmunoglobulinas o anticuerpos intactos naturales comprenden una molécula tetramérica con forma general de Y que tiene un sitio de fijación al antígeno en el extremo de cada brazo superior. Un sitio de fijación a antígeno consiste en el dominio variable de una cadena pesada asociado al dominio variable de una cadena ligera. Más específicamente, el sitio de fijación de un anticuerpo al antígeno está formado esencialmente por las 3 CDR del dominio variable de una cadena pesada (V_H) y las 3 CDR del dominio variable de la cadena ligera (V_L). Tanto en V_L como en V_H, las CDR se alternan con 4 regiones flanqueantes (FR, por su nombre en inglés) que forman una cadena polipeptídica con la fórmula general

(i) FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (I)

en donde se describe la cadena polipeptídica desde el comienzo en el extremo amino hasta terminar en el extremo

carboxilo. Las CDR de V_H y V_L también se denominan H1, H2, H3 y L1, L2, L3, respectivamente. La determinación de lo que constituye una FR o una CDR se hace normalmente mediante la comparación de las secuencias aminoacídicas de numerosos anticuerpos generados en la misma especie, y se conocen en la técnica las normas generales para su identificación («Sequences of proteins of immunological interest», Kabat E. A. et al., US Department of Health and Human Service, Public Health Service, National Institute of Health).

La contribución hecha por un dominio variable de la cadena ligera a la energética de la fijación es pequeña en comparación con la hecha por el dominio variable de la cadena pesada que está asociada, y los dominios variables de la cadena pesada aislados son capaces de fijarse al antígeno por sí solos. Tales moléculas se suelen denominar habitualmente anticuerpos de dominio único (Ward, E. S. et al., *Nature* 341, 544-546 (1989)).

Las CDR forman bucles que, dentro de los dominios, están conectados a una región flanqueante en hoja β . La relación entre la secuencia aminoacídica y la estructura de un bucle se puede describir mediante un modelo de estructura canónica (Clothia et al., *Nature* 342, 887-883 (1989)). De acuerdo con este modelo, los anticuerpos tienen sólo unas pocas conformaciones de cadena principal o «estructuras canónicas» para cada región hipervariable. Las conformaciones se determinan mediante la presencia de unos pocos restos aminoacídicos clave en posiciones específicas de las CDR y, para determinados bucles, en las regiones flanqueantes.

Las regiones hipervariables que tienen la misma conformación en diferentes inmunoglobulinas tienen los mismos, o muy parecidos, restos aminoacídicos en estos sitios.

La inserción de las CDR se ha realizado en los anticuerpos monoclonales para que produzcan anticuerpos humanos humanizados con una afinidad de fijación significativamente menor que la del anticuerpo de roedor donante de las CDR. Los hallazgos han indicado que, además de la transferencia de las CDR, en algunos casos se podrían necesitar cambios dentro de la región flanqueante de la secuencia humana para que el producto con la CDR insertada proporcione una actividad satisfactoria de fijación al antígeno.

Queen et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 10029-10033 (1989)) describieron que las CDR de un anticuerpo monoclonal murino anti-Tac se podrían insertar en una región flanqueante de humano. Las regiones flanqueantes de humano se eligieron por tener la máxima homología posible con la secuencia murina. Los autores utilizaron un modelo informático del anticuerpo original murino para identificar los restos aminoacídicos localizados dentro de las FR que están muy cerca de poder interactuar con las CDR o el antígeno. Estos restos se mutaron al resto encontrado en la secuencia murina. El anticuerpo humanizado anti-Tac tenía una afinidad que era sólo aproximadamente 1/3 de la del anticuerpo murino anti-Tac y el mantenimiento del carácter humano de este anticuerpo resultó problemático.

El tratamiento de las enfermedades con una concentración muy alta de IgE puede requerir un anticuerpo con una afinidad más alta para que se reduzca el riesgo de inmunogenia y para expandir las indicaciones clínicas para las enfermedades con una elevada concentración de IgE, p. ej., la dermatitis atópica. Así pues, es deseable tener un anticuerpo anti-IgE con un mayor nivel de humanización y una afinidad mucho más alta por la IgE. Los anticuerpos de esta invención son anticuerpos anti-IgE de humano con afinidades ultraaltas y un grado de homología más alto con la secuencia de humano, lo que disminuye el riesgo de inmunogenia.

Así pues, existe una necesidad de anticuerpos humanizados de mayor afinidad que permitirán disminuir la cantidad de anticuerpo necesaria para tratar la enfermedad, gracias a lo cual se disminuyen los posibles efectos secundarios de inmunogenia del fármaco y el coste para el paciente. Además, la presente invención mejora la probabilidad de que se identifiquen anticuerpos de alta afinidad.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-IgE de alta afinidad tal y como está definido en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención da a conocer un anticuerpo aislado o un fragmento de fijación al antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde CDRL1 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 5, CDRL2 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 8, CDRL3 consiste en la secuencia aminoacídica **QQSWSWPTT**, CDRH1 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 15, CDRH2 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 25 y CDRH3 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 26, en donde el anticuerpo o fragmento del mismo se fija especialmente a la IgE. En una realización, la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo comprende la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 63 o la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 64. En otra realización, la región

variable de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 63 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 64. En otra realización, el anticuerpo o el fragmento de fijación al antígeno del mismo comprende además una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada. En otra realización, la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60. Aún en otra realización, el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo está conectado además a una marcación.

La invención da a conocer además una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo o el fragmento de fijación al antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención da a conocer además un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo.

La invención da a conocer además un método para diagnosticar un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno; y determinar el nivel de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación al antígeno por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel de retención más alto o más bajo del anticuerpo o del fragmento de fijación al antígeno por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE.

La presente invención da a conocer además el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo para ser usado en un método para tratar un trastorno asociado a una cantidad anómalamente alta de IgE en un sujeto. En una realización concreta, el trastorno es asma, rinitis alérgica, eccema, urticaria, dermatitis atópica o una alergia alimentaria.

La invención da a conocer además un método para medir la cantidad de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo; y determinar el nivel de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación al antígeno por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel más alto o más bajo de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación al antígeno por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene una mayor o menor cantidad de moléculas de IgE con respecto a la del sujeto de control.

La invención da a conocer además un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación del antígeno del mismo.

La invención da a conocer además una célula que comprende el vector que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la invención o el fragmento de fijación al antígeno del mismo. En realizaciones preferidas, la célula tiene el número de depósito de la ATCC PTA-5680.

También se describe en la presente memoria un método para hacer tales anticuerpos de alta afinidad a partir de una molécula de anticuerpo madre mediante la combinación de la humanización y la maduración de afinidad de un anticuerpo no humano en un método rápido y eficaz que incrementa significativamente la afinidad de fijación por encima de otros métodos. Este método implica la modificación simultánea o secuencial de las CDR y de las regiones flanqueantes de la molécula de anticuerpo madre mediante la generación de una genoteca de CDR y/o regiones flanqueantes sustituidas aleatoriamente, y el cribado para seleccionar las moléculas de alta afinidad.

Breve descripción de las figuras

En la figura 1 se representa esquemáticamente el vector fágico utilizado en la clonación y cribado del anticuerpo.

En la figura 2 se representan esquemáticamente los oligonucleótidos útiles para la generación de las variantes de anticuerpo.

En la figura 3A se representa la comparación de las cadenas ligeras del anticuerpo murino anti-IgE TES-C21 y el molde humano combinado de L16 y JK4.

En la figura 3B se representa la comparación de las cadenas pesadas de TES-C21 y el molde humano combinado de DP88 y JH4b.

En la figura 4 se presenta una tabla de las variantes de los restos flanqueantes que tienen mayor afinidad que el

TES-C21 madre.

En las figuras 5A y B se representan las curvas de titulación por ELISA para los clones 4, 49, 72, 78 y 136, en comparación con el Fab madre del TES-C21 y el control negativo (5D12).

5 En la figura 6 se representa un ensayo de inhibición de los clones 2C, 5A y 5I, en comparación con el TES-C21 madre y un anticuerpo de control negativo.

En la figura 7A se representan las secuencias de los clones que tienen una combinación de las mutaciones beneficiosas que dan lugar a una afinidad incluso mayor por la IgE.

En las figuras 8A y 8B se representan las secuencias flanqueantes de toda la región variable de la cadena ligera para los clones 136, 1, 2, 4, 8, 13, 15, 21, 30, 31, 35, 43, 44, 53, 81, 90 y 113.

10 En las figuras 9A y 9B se representan las secuencias flanqueantes de toda la región variable de la cadena pesada para 35 clones.

En las figuras 10A a 10F se representan las secuencias completas de las cadenas ligera y pesada para los clones 136, 2C, 5I, 5A, 2B y 1136-2C.

Descripción detallada de la invención

15 Definiciones

La terminología utilizada a lo largo de esta solicitud debe interpretarse con el significado habitual y típico que le dan normalmente los expertos en la técnica. No obstante, los solicitantes desean que a la siguiente terminología se le dé el significado concreto que se define a continuación.

20 La frase «sustancialmente idéntica» con respecto a una secuencia polipeptídica de la cadena de un anticuerpo se puede interpretar como una cadena de anticuerpo que muestra al menos una identidad de secuencia de al menos el 70% o el 80% o el 90% o el 95% con la secuencia polipeptídica de referencia. La terminología con respecto a una secuencia de ácido nucleico se puede interpretar como una secuencia de nucleótidos que muestran una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 85% o el 90% o el 95% o el 97% con la secuencia de ácido nucleico de referencia.

25 La terminología «identidad» u «homología» se debe interpretar que significa el porcentaje de restos aminoácidos de la secuencia candidata que son idénticos a los restos de la secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias e introducir los huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje de identidad máximo para la secuencia completa, y no se debe considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Ni las extensiones del extremo amino ni carboxilo ni las inserciones se debe interpretar que reducen la identidad ni la homología. Los métodos y los programas informáticos para el alineamiento se conocen bien en la técnica. La identidad de secuencia se puede medir con los programas informáticos de análisis de secuencias.

35 El término «anticuerpo» se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (entre ellos los anticuerpos monoclonales completos), los anticuerpos policlonales y los anticuerpos multiespecíficos (p. ej., anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos (Ac) y las inmunoglobulinas (Ig) son glucoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos muestran especificidad de fijación por una diana específica, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad por la diana. Los anticuerpos y las inmunoglobulinas nativos son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de unos 150.000 Da, formados por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo.

45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «anticuerpo anti-IgE de humano» hace referencia a un anticuerpo que se fija a la IgE de humano de tal manera que inhibe o reduce sustancialmente la fijación de tal IgE al receptor de alta afinidad, FcεRI.

50 El término «variable» en el contexto del dominio variable de los anticuerpos se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables tienen secuencias muy diferentes entre los anticuerpos y se utilizan para la fijación y especificidad de cada anticuerpo concreto a su diana concreta. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye equitativamente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidos como regiones hipervariables,

en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones flanqueantes (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, que en buena parte adoptan una configuración de hojas β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de ella, la estructura de hojas β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas, muy próximas entre sí, mediante las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de fijación de la diana en los anticuerpos (véase Kabat et al.). Tal y como se utiliza en la presente memoria, la numeración de los restos aminoacídicos de las inmunoglobulinas se hace de acuerdo con el sistema de numeración de restos aminoacídicos de inmunoglobulinas de Kabat et al. (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, Md. 1987), a menos que se indique otra cosa.

La terminología «fragmento de anticuerpo» hace referencia a una porción de un anticuerpo completo, por lo general la fijación a la diana o la región variable. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv. La frase «fragmento funcional o análogo» de un anticuerpo es un compuesto que tiene actividad biológica cualitativa en común con un anticuerpo completo. Por ejemplo, un fragmento funcional o análogo de un anticuerpo anti-IgE es uno capaz de fijarse a una inmunoglobulina IgE de tal manera que impide o reduce sustancialmente la capacidad que tal molécula tiene para fijarse al receptor de alta afinidad, Fc ϵ RI. Tal y como se utiliza en la presente memoria, «fragmento funcional», con respecto a los anticuerpos, hace referencia a los fragmentos Fv, F(ab) y F(ab')₂. Un fragmento «Fv» es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de fijación y reconocimiento completo por la diana. Esta región consiste en un dímero formado del dominio variable formado por una cadena ligera y una cadena pesada en una asociación no covalente y estrecha (dímero V_H-V_L). En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de fijación para la diana en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo su especificidad de fijación por la diana. No obstante, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas de una diana) tiene la capacidad de reconocer y fijarse a la diana, aunque con menor afinidad que el sitio de fijación completo. Los fragmentos de anticuerpo «Fv monocatenarios» o «scFv» comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Por lo general, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para que se fije a la diana.

El fragmento Fab contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab') se producen por la escisión del puente disulfuro entre las cisteínas de la bisagra del producto de digestión de la pepsina, el F(ab')₂. Los expertos en la técnica conocen bien otras conjugaciones químicas de los fragmentos de anticuerpo.

La terminología «anticuerpo monoclonal», tal y como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, a saber, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones que se producen de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un único sitio diana. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en la diana. Además de por su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos por poderse sintetizar mediante el cultivo de hibridomas, sin contaminar con otras inmunoglobulinas. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo por haberse obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo por ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para ser utilizados en la presente invención se pueden aislar de las genotecas de anticuerpos de fagos mediante el uso de las técnicas bien conocidas. Los anticuerpos madre monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256, 495 (1975), o se puede hacer mediante métodos recombinantes.

Las formas «humanizadas» de los anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpo con la que se fijan a la diana) que contienen la secuencia mínima procedente de la inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina de humano. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de un molde elegido de inmunoglobulina de humano.

La terminología «célula», «línea celular» y «cultivo celular» incluye a la progenie. También se debe saber que toda la progenie no tiene por qué tener exactamente el mismo contenido de ADN debido a que pueden aparecer mutaciones deliberadas o involuntarias. Está incluida la progenie variante que tenga la misma función o la misma propiedad biológica, como la que se busca en la célula originalmente transformada. Las «células hospedadoras» utilizadas en la presente invención son por lo general hospedadores procariotas o eucariotas.

«Transformación» de un organismo celular con ADN significa la introducción del ADN en un organismo, de tal modo que el ADN se puede replicar, bien como un elemento extracromosómico o bien mediante integración cromosómica. «Transfección» de un organismo celular con ADN hace referencia a que la célula o el organismo toma el ADN, p. ej., un vector de expresión, tanto si se expresa de hecho alguna secuencia codificante como si no lo hace. La terminología «célula hospedadora transfectada» y «transformada» hace referencia a una célula en la cual se introduce el ADN. La célula se denomina «célula hospedadora» y puede ser procariota o bien eucariota. Las células hospedadora procariotas típicas incluyen diferentes cepas de *E. coli*. Las células hospedadoras eucariotas típicas son de mamífero, tales como de ovario de hámster chino, o células de origen humano. La secuencia de ADN introducida puede ser de la misma especie que la célula hospedadora o de una especie diferente a la de la célula hospedadora, o puede ser una secuencia de ADN híbrida que contiene algo de ADN foráneo y algo de ADN homólogo.

El término «vector» hace referencia a una construcción de ADN que contiene una secuencia de ADN que está unida operativamente a una secuencia de control idónea capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedador idóneo. Tales secuencias de control incluyen un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora optativa para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica los sitios idóneos para la fijación del ribosoma al ARNm, y las secuencias que controlan la terminación de la transcripción y de la traducción. El vector puede ser un plásmido, una partícula de fago, o simplemente un posible inserto genómico. Una vez transformado en un hospedador idóneo, el vector puede replicarse y funcionar de forma independiente al genoma hospedador, o puede, en algunos casos, integrarse por sí solo en el genoma. En la presente especificación, «plásmido» y «vector» a veces se utilizan indistintamente, ya que el plásmido es la forma de vector utilizada con más frecuencia. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores que realizan una función equivalente y que son, o que acaban siendo, conocidas en la técnica.

La expresión «secuencias de control» hace referencia a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedador concreto. Las secuencias de control que son idóneas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, facultativamente una secuencia operadora, y un sitio de fijación de ribosoma. Las células eucariotas se sabe que utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. El ADN para una presecuencia o líder de secreción pueden estar operativamente unidos al ADN que codifica un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación del ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación del ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si su colocación facilita la traducción. Por lo general, «operativamente unido» significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contigua y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos.

«Mamífero», para propósitos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, entre ellos humano, animales domésticos o de granja, primates no humanos y animales de zoo, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

El término «etiquetado con epítipo», cuando se utiliza en la presente memoria en el contexto de un polipéptido, hace referencia a un polipéptido fusionado a una «etiqueta de epítipo». El epítipo polipeptídico de etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el cual se puede generar un anticuerpo, y es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido. Preferiblemente, la etiqueta de epítipo es también razonablemente única para que el anticuerpo no reaccione sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Las etiquetas polipeptídicas idóneas tienen por lo general al menos 6 restos aminoacídicos y normalmente tienen entre aproximadamente 8 y 50 restos aminoacídicos (preferiblemente entre aproximadamente 9 y 30 restos). Los ejemplos incluyen el polipéptido de etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field et al., *Mol. Cell. Biol.* 8: 2159-2165 (1988)); la etiqueta de c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 dirigidos contra ella (Evan et al., *Mol. Cell. Biol.* 5(12): 3610-3616 (1985)); y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky et al., *Protein Engineering* 3(6): 547-553 (1990)). En algunas realizaciones, la etiqueta de epítipo puede ser un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de incrementar *in vivo* la semivida en el suero de la molécula de IgG.

La palabra «marcación», cuando se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un compuesto o composición detectable que se puede conjugar directa o indirectamente a una molécula o proteína, p. ej., un anticuerpo. La

marcación puede ser detectable por sí sola (p. ej., marcaciones de radioisótopo o marcaciones fluorescentes) o, en el caso de una marcación enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de sustrato que es detectable.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «fase sólida» significa una matriz no acuosa a la cual se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Ejemplo de fases sólidas abarcadas por la presente memoria incluyen las formadas parcial o totalmente por vidrio (p. ej., vidrio con poros controlados), polisacáridos (p. ej., agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol de polivinilo y siliconas. En algunas realizaciones, en función del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía de afinidad).

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «trastorno mediado por IgE» significa una afección o enfermedad que se caracteriza por la sobreproducción y/o hipersensibilidad a la inmunoglobulina IgE. Específicamente, se debería interpretar que incluye las afecciones asociadas a la hipersensibilidad anafiláctica y a las alergias atópicas, entre ellas, por ejemplo: asma, rinitis alérgica y conjuntivitis (fiebre del heno), eccema, urticaria, dermatitis atópica y alergias alimentarias. La afección fisiológica grave del choque anafiláctico causado por, p. ej.,
15 picaduras de avispa, mordeduras de serpiente, alimentos o medicación, también está englobada por el alcance de este término.

Generación de anticuerpos

20 El anticuerpo de partida u «madre» se puede preparar con los métodos disponibles en la técnica para generar tales anticuerpos. Estos métodos se conocen bien. Los métodos de ejemplo para generar el anticuerpo de partida se describen con más detalle en los apartados que vienen a continuación.

La afinidad de fijación del anticuerpo se determina antes de generar un anticuerpo de alta afinidad de la presente invención. De igual forma, el anticuerpo se puede someter a otros ensayos de actividad biológica, p. ej., para evaluar la eficacia como terapéutico. Tales ensayos se conocen bien en la técnica y dependen de la diana y del uso pretendido para el anticuerpo.

25 Para el cribado de anticuerpos que se fijan a un epítipo concreto (p. ej., los que bloquean la fijación de la IgE a su receptor de alta afinidad), se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado convencional, tal como el descrito en «Antibodies: A Laboratory Manual» (Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988)). Como alternativa, el mapeo de epítopos se puede realizar para determinar si el anticuerpo se fija a un epítipo de interés. Facultativamente, la afinidad de fijación del anticuerpo por un homólogo de la diana utilizada para generar el
30 anticuerpo (donde el homólogo es de una especie diferente) se puede valorar mediante los métodos conocidos en la técnica. Tal y como se describe en la presente memoria, la otra especie es un mamífero no humano al cual se administrará el anticuerpo en los estudios preclínicos. En consecuencia, la especie puede ser un primate no humano, tal como un macaco Rhesus, macaco cangrejero, mandril, chimpancé y macaco. De forma específica, la especie puede ser un roedor, gato o perro, por ejemplo.

35 El anticuerpo madre se altera de acuerdo con la presente invención para generar un anticuerpo que tiene una afinidad de fijación más alta o más fuerte por la diana que el anticuerpo original. El anticuerpo de alta afinidad resultante tiene una afinidad de fijación por la diana que es de al menos aproximadamente 10 veces más alta, o al menos aproximadamente 20 veces más alta, o al menos aproximadamente 500 veces más alta, o puede ser 1000 a
40 5000 veces más alta que la afinidad de fijación del anticuerpo original (madre) por la diana. El grado de realce de la afinidad de fijación necesaria o deseada dependerá de la afinidad de fijación inicial del anticuerpo madre.

En general, el método para fabricar anticuerpos de alta afinidad a partir de un anticuerpo madre implica las siguientes etapas:

- 45 1. Obtener o seleccionar un anticuerpo madre que se fija a la diana de interés, que comprende dominios variables de las cadenas ligera y pesada. Esto se puede realizar mediante técnicas de hibridoma tradicionales, técnicas de exposición de fagos o cualquier otro método con el que se genere un anticuerpo específico de una diana.
- 50 2. Seleccionar una secuencia flanqueante cuya secuencia sea cercana a la de la región flanqueante madre, preferiblemente una secuencia molde de humano. Este molde se puede elegir basándose en, p. ej., su longitud global comparativa, el tamaño de las CDR, los restos aminoacídicos localizados en la unión entre la secuencia flanqueante y las CDR, homología global, etc. El molde elegido puede ser una mezcla de más de una secuencia o puede ser un molde consenso.
3. Generar una genoteca de clones mediante la realización de sustituciones aminoacídicas al azar en todas y cada una las posibles posiciones de las CDR. También se pueden sustituir aleatoriamente los aminoácidos

en el molde de secuencia flanqueante de humano que están, p. ej., adyacentes a las CDR o que pueden afectar a la fijación o al plegamiento, con todos los posibles aminoácidos, y generar así una genoteca de sustituciones en las secuencias flanqueantes. Estas sustituciones en las secuencias flanqueantes se pueden valorar por su posible efecto sobre la fijación a la diana y el plegamiento del anticuerpo. La sustitución de aminoácidos en la secuencia flanqueante se puede realizar simultáneamente o bien secuencialmente a la sustitución de los aminoácidos en las CDR. Un método para generar la genoteca de variantes es mediante síntesis de oligonucleótidos.

4. Construir un vector de expresión que comprende las variantes de las cadenas pesada y/o ligera generadas en la etapa (3) que podría comprender las fórmulas: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 (I) y FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4 (II), en donde FRL1, FRL2, FRL3, FRL4, FRH1, FRH2, FRH3 y FRH4 representan las variantes de las secuencias flanqueantes del molde de las cadenas ligera y pesada elegidas en la etapa 3, y las CDR representan las CDR variantes de las CDR del anticuerpo madre. En la figura 1 se representa un ejemplo de un vector que contiene tales secuencias de las cadenas ligera y pesada.

5. Cribar la genoteca de clones contra la diana específica y los clones que se fijan a la diana se criban para detectar los que tienen mejorada la afinidad de fijación. Se podrían seleccionar los clones que se fijan con mayor afinidad que la molécula madre. El candidato óptimo de alta afinidad tendrá la afinidad de fijación más grande posible en comparación con el anticuerpo madre, preferiblemente de más de 20 veces, 100 veces, 1000 veces o 5000 veces. Si la variante elegida contiene determinados aminoácidos que son indeseables, tal como un sitio de glucosilación que se ha introducido o un sitio inmunógeno en potencia, los aminoácidos se podrían reemplazar con más restos aminoacídicos beneficiosos y se volverá a valorar la afinidad de fijación.

También se puede utilizar este método para generar anticuerpos de alta afinidad a partir de un anticuerpo madre completamente humano mediante la sustitución aleatoria únicamente de las regiones CDR, y dejar intacta las regiones flanqueantes de humano.

Debido a mejora de las técnicas de cribado de alta resolución y de los vectores tales como el descrito en la figura 1, un experto puede cribar con rapidez y eficacia una genoteca muy completa de sustituciones en todos los sitios de una CDR dada y/o de una región flanqueante. Mediante la sustitución aleatoria y simultánea de todos los aminoácidos en todas las posiciones, se pueden cribar las posibles combinaciones que incrementan significativamente la afinidad que no se habría anticipado o identificado mediante la sustitución individual debido a, p. ej., la sinergia.

Preparación del anticuerpo madre

A. Preparación de la diana

Las dianas solubles o los fragmentos de las mismas se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos. El anticuerpo está dirigido contra la diana de interés. Preferiblemente, la diana es un polipéptido importante desde el punto de vista biológico, y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar lugar a un beneficio terapéutico en dicho mamífero. Sin embargo, los anticuerpos se pueden dirigir contra dianas no polipeptídicas. Cuando la diana es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (p. ej., receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. La diana de la presente invención es IgE. Se pueden utilizar células completas como inmunógeno para fabricar los anticuerpos. La diana se puede producir de forma recombinante o se puede fabricar con métodos sintéticos. La diana también se puede aislar de una fuente natural.

Para las moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden utilizar fragmentos de estos (p. ej., el dominio extracelular de un receptor) a modo de inmunógeno. Como alternativa, las células que expresan la molécula transmembranaria se pueden utilizar a modo de inmunógeno. Tales células se obtienen de una fuente natural (p. ej., líneas celulares de mastocitos) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para que expresen la molécula transmembranaria. Otras dianas y formas de las mismas y que resultan útiles para la preparación de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

B. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se suelen generar en mamíferos no humanos mediante varias inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de la diana pertinente en combinación con un adyuvante. Puede ser útil conjugar la diana pertinente a una proteína que es inmunógena en la especie a inmunizar, p. ej., la hemocianina de la lapa gigante. Se conocen bien en la técnica muchos agentes capaces de desencadenar una respuesta inmunógena.

Los animales se inmunizan contra la diana, conjugados inmunógenos o derivados mediante la combinación de la

5 proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con el adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución por vía intradérmica. Un mes después, a los animales se les da una inyección de refuerzo con de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del péptido o conjugado en el adyuvante incompleto de Freund mediante inyección subcutánea en varios sitios. De 7 a 14 días después, se desangran los animales y se les analiza el suero para titular el anticuerpo. A los animales se les da una inyección de refuerzo hasta que la titulación alcanza un valor estable.

El anticuerpo de mamífero seleccionado tendrá normalmente una afinidad de fijación suficientemente fuerte por la diana. Por ejemplo, el anticuerpo se puede fijar la diana anti-IgE de humano con un valor de afinidad de fijación (Kd) de aproximadamente 1×10^{-8} M. La afinidad de los anticuerpos se puede determinar mediante fijación hasta saturación; inmunoensayo enzimático (ELISA); y ensayos de competición (p. ej., radioinmunoensayos).

10 Para cribar los anticuerpos que se fijan a la diana de interés, se puede realizar un ensayo de fijación cruzada convencional, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Como alternativa, se puede realizar el mapeo de epítopos, p. ej., como el descrito en Champe et al., *J. Biol. Chem.* 270: 1388-1394 (1995), para determinar la fijación.

C. Anticuerpos monoclonales

15 Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos que reconocen un único sitio antigénico. Su especificidad uniforme hace que los anticuerpos monoclonales sean mucho más útiles que los anticuerpos policlonales, que normalmente contienen anticuerpos que reconocen muchos sitios antigénicos diferentes. Los anticuerpos monoclonales se pueden generar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinante.

20 En el método del hibridoma, un ratón y otro animal hospedador adecuado, tal como un roedor, se inmuniza como está descrito más arriba, para inducir linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se fijarán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma mediante el uso de un agente de fusión idóneo, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principals and Practice*, págs. 590-103 (Academic Press, 1986)).

25 Las células de hibridoma así preparadas se inoculan y se hacen crecer en un medio de cultivo idóneo que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de las células deficientes en HGPRT. Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan con eficacia, soportan la producción estable de anticuerpos en gran cantidad desde las células productoras del anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito las líneas celulares de mieloma de humano y de heteromieloma de humano y ratón (Kozbar, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc. Nueva York, 1987)).

35 Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución límite y se pueden hacer crecer mediante métodos estándares (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principals and Practice*, págs. 59-103, Academic Press, 1986)). Están incluidos los medios de cultivo idóneos para este propósito. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan idóneamente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de la inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía en hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

45 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla con facilidad y se secuencia con los procedimientos convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de fijarse específicamente a genes que codifican las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven de fuente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en los vectores de expresión que, a continuación, se transfieren al interior de células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células NS0, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias murinas por la secuencia codificante homóloga de los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de humanos (patente de los EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984) o mediante la unión covalente al polipéptido de inmunoglobulina.

D. Anticuerpos humanizados

La humanización es una técnica para fabricar un anticuerpo quimérico en donde sustancialmente menos que un dominio variable intacto de humano ha sido sustituido por la correspondiente secuencia de una especie no humana. Un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos aminoacídicos no humanos a menudo se denominan restos de «importación», que típicamente se toman de un dominio variable de «importación». La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechman et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyens et al., *Science* 239: 1534-1536 (1988)), al sustituir las secuencias de CDR no humanas o las secuencias de CDR por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4.816.567). Tal y como se pone en práctica en la presente invención, el anticuerpo humanizado podría tener algunos restos de CDR y algunos restos de FR sustituidos por los restos de los sitios análogos en los anticuerpos murinos.

La elección de los dominios variables de humano, tanto de cadena ligera como de la pesada, a utilizar para fabricar los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la capacidad antigénica. De acuerdo con el denominado método de «mejor ajuste», la secuencia del dominio variable de un anticuerpo no humano se compara con la colección de las secuencias conocidas de dominios variables de humano. La secuencia de humano que está más cercana a la del anticuerpo madre no humano se acepta a continuación como la región flanqueante de humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Clothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región flanqueante concreta procedente de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligera o pesada. La misma región flanqueante se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.* 151: 2623 (1993)).

E. Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diferentes técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían por la digestión proteolítica de los anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992), y Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se producen ahora directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de una genoteca de anticuerpos en fagos. Como alternativa, los fragmentos F(ab')₂-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y se puede conjugar químicamente para formar los fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv) (solicitud de patente PCT WO 93/16185).

Preparación de anticuerpos de alta afinidad

Una vez que el anticuerpo madre se ha identificado y se ha aislado, se alteran uno o más restos aminoacídicos en una o más de las regiones variables del anticuerpo madre. Como alternativa, o además, se pueden introducir una o más sustituciones de restos de las regiones flanqueantes en el anticuerpo madre, que dan lugar a una mejoría de la afinidad de fijación del anticuerpo, por ejemplo, por la IgE de humano. Los ejemplos de restos de la región flanqueante a modificar incluyen los que se fijan no covalentemente, de forma directa, a la diana (Amit et al. *Science* 233: 747-753 (1986)); interaccionan con/efectúan la conformación de la CDR (Clothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)); y/o participan en la interfaz de VL-VH (patente europea EP 239 400 B1). En determinadas realizaciones, la modificación de uno o más de tales restos de las regiones flanqueantes da lugar a que mejore la afinidad de fijación del anticuerpo por la diana de interés.

Las modificaciones de las propiedades biológicas de los anticuerpos se pueden cumplir mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente por su efecto a la hora de mantener, p. ej., (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal; (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Las sustituciones no conservativas entrañarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de la secuencia aminoacídica se preparan mediante una serie de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o específica de sitio), mutagénesis por PCR, y mutagénesis de casete de una variante preparada antes o una versión no variante del anticuerpo en función de la especie. El método preferido para generar variantes es una síntesis mediada por oligonucleótidos. Tal y como se describe en la presente memoria, la variante de anticuerpo solo tendrá sustituciones de restos en una única región hipervariable, p. ej., de aproximadamente dos a aproximadamente quince sustituciones en la región hipervariable.

Un método para generar la genoteca de variantes es mediante la síntesis mediada por oligonucleótidos de acuerdo

con el esquema representado en la figura 2. Tres oligonucleótidos de aproximadamente 100 nucleótidos cada uno se pueden sintetizar para que abarquen toda la región variable de la cadena ligera o de la cadena pesada. Cada oligonucleótido puede comprender: (1) un tramo de 60 aminoácidos generados mediante el triplete (NNK)₂₀, en donde N es cualquier nucleótido y K es G o T, y (2) un solapamiento de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos con el siguiente oligonucleótido o bien con la secuencia del vector en cada extremo. Tras la hibridación de estos tres oligonucleótidos en una reacción de PCR, la polimerasa rellenará la hebra opuesta, lo que genera una secuencia bicatenaria completa de la región variable de la cadena ligera o pesada. El número de tripletes se puede ajustar a cualquier longitud de repeticiones y su posición dentro del oligonucleótido se puede elegir de modo que solo se sustituyen los aminoácidos en una CDR o región flanqueante dada. Mediante el uso de (NNK), cualquiera de los veinte aminoácidos puede aparecer en cada posición de las variantes codificadas. No se sustituirá la secuencia solapante de 5 a 10 aminoácidos (15 a 30 nucleótidos), pero esta se puede elegir para que caiga dentro de las regiones apiladas de la región flanqueante o se puede sustituir mediante una ronda de síntesis independiente o posterior. Los métodos para sintetizar los oligonucleótidos se conocen bien en la técnica y están también disponibles en el mercado. Los métodos para generar las variantes de anticuerpo de estos oligonucleótidos se conocen bien en la técnica, p. ej., PCR.

La genoteca de variantes de las cadenas ligera y pesada, que difiere en posiciones aleatorias de sus secuencias, se puede construir en cualquier vector de expresión, tal como un bacteriófago, específicamente el vector de la figura 1, cada uno de los cuales contiene el ADN que codifica una variante concreta de las cadenas ligera y pesada.

Después de la producción de las variantes de anticuerpo, se determina la actividad biológica de la variante con respecto al anticuerpo madre. Tal y como se observó más arriba, esto implica la determinación de la afinidad de fijación de la variante por la diana. Existen numerosos métodos de alto rendimiento para cribar con rapidez las variantes de anticuerpos por su capacidad para fijarse a la diana de interés.

Una o varias de las variantes de anticuerpo seleccionadas de este cribado inicial se pueden cribar a continuación por una mejor afinidad de fijación con respecto al anticuerpo madre. Un método corriente para determinar la afinidad de fijación es mediante la valoración de las constantes de la velocidad de asociación y de disociación mediante el uso de un sistema de resonancia de plasmón superficial BIAcore™ (BIAcore, Inc.). Un chip biosensor se activa para la conjugación covalente de la diana de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BIAcore). A continuación, la diana se diluye y se inyecta sobre el chip para obtener una señal en unidades de respuesta (UR) del material inmovilizado. Ya que la señal en UR es proporcional a la masa del material inmovilizado, esto representa un intervalo de densidades de la diana inmovilizada en la matriz. Los datos de disociación se ajustan a un modelo de un sitio para obtener la $k_{off} \pm d. e.$ (desviación estándar de las mediciones). La constante de velocidad de pseudoprimer orden (k_s) se calcula para cada curva de asociación y se representa en función de la concentración de proteínas para obtener la $k_{on} \pm e. e.$ (error estándar de ajuste). Las constantes de disociación en equilibrio para la fijación, K_d , se calculan de las mediciones de SPR como k_{off}/k_{on} . Ya que la constante de disociación en equilibrio, K_d , es inversamente proporcional a la k_{off} , se puede hacer una estimación de la mejoría de la afinidad al suponer que la velocidad de asociación (k_{on}) es constante para todas las variantes.

El candidato o candidatos resultantes con alta afinidad se pueden someter facultativamente a uno o varios ensayos de la actividad biológica para confirmar que la variante o variantes de anticuerpo con una mejor afinidad de fijación todavía conservan los atributos terapéuticos deseados. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo anti-IgE, se pueden cribar los que bloquean la fijación de la IgE a su receptor e inhiben la liberación de histamina. La variante de anticuerpo óptima conserva la capacidad para fijarse a la diana con una afinidad de fijación significativamente más alta que el anticuerpo madre.

La variante o variantes de anticuerpo así seleccionadas se pueden someter a menudo a más modificaciones en función del uso que se pretende dar al anticuerpo. Tales modificaciones podrían implicar la posterior alteración de la secuencia aminoacídica, la fusión a uno o varios polipéptidos heterólogos, y/o las modificaciones covalentes tales como las elaboradas a continuación. Por ejemplo, cualquier resto de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación adecuada de la variante de anticuerpo puede ser sustituido, en general por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula e impedir la fijación cruzada aberrante. A la inversa, se pueden añadir uno o varios enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar la estabilidad (en particular, cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Vectores

La invención también da a conocer un ácido nucleico aislado que codifica una variante de anticuerpo como la descrita en la presente memoria, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas recombinantes para la producción de la variante de anticuerpo. Para la producción recombinante de la variante de anticuerpo, se aísla el ácido nucleico que la codifica y se introduce en un vector que se puede replicar para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica la variante de anticuerpo se

aísla con facilidad y se secuencian mediante los procedimientos convencionales (p. ej., con sondas oligonucleotídicas que son capaces de fijarse específicamente a los genes que codifican las cadenas ligera y pesada de la variante de anticuerpo).

5 Hay disponibles muchos vectores. Los componentes de vectores incluyen por lo general uno o varios de lo siguiente: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o varios genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

10 El vector de expresión en fagos descrito en la figura 1 comprende un vector M13 utilizado con frecuencia y una señal de secreción vírica del gen III del propio M13 para la secreción y el cribado rápidos de los Fab variantes según los criterios adecuados de especificidad de fijación y afinidad mínima. Este vector no utiliza la secuencia completa del gen III, por lo que no hay exposición en la superficie de la célula bacteriana, sino que más bien los Fab se secretan al espacio periplásmico. Como alternativa, los Fab se podían expresar en el citoplasma y aislar de él. Las cadenas ligera y pesada tienen su propia señal de secreción vírica, pero su expresión depende de un único promotor fuerte e inducible.

15 El vector de la figura 1 también proporciona una etiqueta de His y una etiqueta myc para facilitar tanto la purificación como la detección. Un experto en la técnica reconocerá que los Fab se pueden expresar de forma independiente a partir de promotores diferentes, o que la señal de secreción necesaria no tiene que ser la secuencia vírica elegida, sino que podría ser una secuencia señal eucariota o procariota idónea para la secreción de los fragmentos de anticuerpo desde la célula hospedadora elegida. También se debe reconocer que las cadenas ligera y pesada pueden residir en diferentes vectores.

20 A. Componente de secuencia señal

La variante de anticuerpo de esta invención se puede producir de manera recombinante. La variante también se puede expresar como un polipéptido de fusión fusionado con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo amino maduro de la proteína o polipéptido. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferiblemente una que se reconoce y procesa (a saber, que escinde la peptidasa señal) en la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontes que no reconocen ni procesan la secuencia señal del anticuerpo nativo, la secuencia señal puede ser sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes termoestables de la enterotoxina II. O en el caso del vector de la figura 1, la secuencia señal elegida era una secuencia señal vírica del gen III. Para la secreción desde la levadura, la secuencia señal nativa se puede sustituir por, p. ej., el líder de la invertasa de la levadura, líder del factor α (que incluye los líderes del factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 90/13646. Para la expresión en las células de mamífero están disponibles las secuencias señal de mamífero, así como los líderes de secreción víricos, por ejemplo, la señal de la gD del herpes simple. El ADN para tal región precursora está ligado en fase al marco de lectura del ADN que codifica la variante del anticuerpo.

35

B. Componente de origen de replicación

Los vectores normalmente contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o varias células hospedadoras seleccionadas. Por lo general, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico hospedador e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Tales secuencias se conocen bien en muchas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es idóneo para la mayoría de bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2μ es idóneo para la levadura y diferentes orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de células de mamífero. Por lo general, el componente del origen de replicación no se necesita para los vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 típicamente se podría utilizar solo porque contiene el promotor temprano).

45

C. Componente del gen para selección

Los vectores pueden contener un gen para selección, también denominado un marcador de selección. Los genes para selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotrofas, o (c) suministran nutrientes críticos que no están disponibles en los medios complejos, p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa para los bacilos.

50

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, así pues, sobreviven al tratamiento de selección. Los ejemplos de selección dominante utilizan los

fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección idóneos para las células de mamífero son los que permiten la identificación de las células competentes para la toma del ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de primate de la metalotioneína, de la adenosina desaminasa, de la ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección *DHFR* se identifican primero mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de la DHFR. Una célula hospedadora idónea cuando se emplea la DHFR de tipo silvestre es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) que carece de la actividad de la DHFR.

Como alternativa, las células hospedadoras (en particular las hospedadoras de tipo silvestre que contienen la DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican el anticuerpo, proteína DHFR de tipo silvestre y otro marcador de selección, tal como la aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH), se pueden seleccionar mediante el crecimiento celular en el medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección, tal como un antibiótico aminoglucosídico, p. ej., kanamicina, neomicina o G418 (patente de los EE. UU. n.º 4.965.199).

Un gen para selección idóneo para ser usado en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature* 282: 39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa variante de la levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics* 85: 12 (1977). A continuación, la presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de la levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De igual forma, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante los plásmidos que se sabe que llevan el gen *Leu2*.

D. Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está operativamente unido al ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores idóneos para ser usados con los hospedadoras procariotas incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de la β -lactamasa y la lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son idóneos otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para el uso en los sistemas bacterianos también pueden contener una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica el anticuerpo.

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

Ejemplos de secuencias promotoras idóneas para ser usadas con los hospedadores de la levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores para la levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de que se transcriben controlados por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores idóneos para ser usados para la expresión en la levadura se describen con más detalle en la patente europea EP 73 657. Los potenciadores para la levadura también se utilizan ventajosamente con los promotores para la levadura.

La transcripción del anticuerpo desde los vectores en las células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por los promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del polioma, virus de la differoviruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y lo más preferiblemente el virus 40 del simio (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, p. ej., el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de

promotores de choque térmico, siempre y cuando tales promotores sean compatibles con los sistemas de las células hospedadoras.

5 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen ventajosamente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene ventajosamente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en los hospedadores de mamífero que utilizan el virus del papiloma bovino como vector se describe en la patente de los EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de los EE. UU. n.º 4.601.978. Como alternativa, el ADNc del interferón β de humano se ha expresado en las células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Como alternativa, la repetición terminal
10 larga del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar a modo de promotor.

E. Componente del elemento potenciador

15 La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de esta invención en los eucariotas superiores a menudo se incrementa por la introducción de una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína α e insulina). Sin embargo, típicamente, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 del lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus del lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) o elementos potenciadores para la activación de los
20 promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición en 5' o 3' de la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza preferiblemente del lado 5' del promotor.

F. Componente de terminación de la transcripción

25 Los vectores de expresión utilizados en las células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insecto, vegetales, animales, de humano o nucleadas de otros organismos pluricelulares) puede también contener las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias suelen estar disponibles desde las regiones sin traducir en 5', y de vez en cuando en 3', de los ADN o los ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase, p. ej., la solicitud de patente internacional
30 WO 94/11026.

30 Selección y transformación de las células hospedadoras

Las células hospedadoras idóneas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria son células procariontas, de levadura o de eucariotas superiores. Los procariontas idóneos para este propósito incluyen organismos tanto gramnegativos como grampositivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*,
35 *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*, así como los bacilos, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son idóneas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

40 Además de los procariontas, los microorganismos eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son hospedadores idóneos para la clonación o la expresión de los vectores que codifican el anticuerpo. *Saccharomyces cerevisiae* es el utilizado con más frecuencia como microorganismo hospedador entre los eucariotas inferiores. Sin embargo, muchos otros géneros, especies y cepas están corrientemente disponibles y son útiles en la presente memoria, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*; *Candida*; *Trichoderma*; *Neurospora crassa*; y hongos filamentosos tales como p. ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y hospedadores de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

45 Las células hospedadoras idóneas para la expresión de los anticuerpos glucosilados proceden de organismos pluricelulares. En principio, se puede trabajar con cualquier cultivo de células eucariotas superiores, tanto si es de cultivo de vertebrados como de invertebrados. Ejemplos de células de invertebrados incluyen las células vegetales y de insectos, Luckow et al., *Bio/Technology* 6, 47-55 (1988); Miller et al., *Genetic Engineering*, Setlow et al., eds. Vol 8, págs. 277-279 (Plenum Publishing 1986); Mseda et al., *Nature* 315, 592-594 (1985). Se han identificado muchas
50 cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células hospedadoras de insectos permisivas de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una serie de cepas víricas para la transfección, p. ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus se pueden utilizar como el virus en la presente memoria de acuerdo con la presente invención, en particular para la transfección de las

células de *Spodoptera frugiperda*. Además, los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como hospedadores.

Las células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados, en cultivo (cultivo de tejidos), se ha convertido en un procedimiento cotidiano. Véase *Tissue Culture*, Academic Press, Kruse y Patterson, eds. (1973).

5 Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos útiles son de riñón de mono; línea de riñón embrionario de humano; células de riñón de cría de hámster; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); células de Sertoli de ratón; células de carcinoma cervical de humano (HELA); células de riñón de perro; células de pulmón de humano; hepatocitos de humano; tumor mamario de ratón; y células NS0.

10 Las células hospedadoras se transforman con los vectores descritos más arriba para la producción de anticuerpos y se cultivan en un medio de nutrientes convencional modificado como sea adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

15 Las células hospedadoras utilizadas para producir la variante de anticuerpo de esta invención se pueden cultivar en muchos medios diferentes. Los medios disponibles en el mercado, tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial (MEM, Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Sigma) son idóneos para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enzymol.* 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), patentes de los EE. UU. n.ºs 4.767.704, 4.657.866, 4.560.655, 5.122.469, 5.712.163 o 6.048.728 se pueden utilizar como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruros de X, donde X es sodio, calcio, magnesio y fosfatos), tamponantes (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos que suelen estar presentes en concentraciones finales del intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro complemento necesario se puede incluir en concentraciones adecuadas que deberían conocer los expertos en la técnica. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

Purificación de los anticuerpos

30 Al utilizar técnicas recombinantes, la variante de anticuerpo se puede producir de forma intracelular, en el espacio periplásmico o se puede secretar directamente al medio. Si la variante de anticuerpo se produce dentro de la célula, como una primera etapa, el residuo particulado, bien de células hospedadoras o de fragmentos de la lisis, se puede retirar, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. En Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992) se describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, por su nombre en inglés) durante aproximadamente 30 minutos. El residuo celular se puede retirar por centrifugación. Cuando la variante de anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se suelen concentrar primero con un filtro para concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o de Millipore Pellicon. En cualquiera de las etapas anteriormente dichas se puede incluir un inhibidor de proteasas, tal como el PMSF, para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes inesperados.

45 La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar con el uso de, por ejemplo, cromatografía en hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, en donde la cromatografía de afinidad es la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de aquel dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en la variante de anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar los anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas de IgG1, IgG2 o IgG4 de humano (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para las IgG3 de humano (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la cual se une el ligando de afinidad es agarosa en la mayoría de los casos, pero están disponibles otras matrices. Las matrices estables desde el punto de vista mecánico, tales como el vidrio de poros controlados o el poli(estirenodivinil)benzeno, permiten una velocidad de flujo más rápida y un tiempo de procesamiento más corto que los que se consiguen con la agarosa. Cuando la variante de anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para la purificación. Según la variante de anticuerpo a recuperar, están también disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía de SEPHAROSETM en una resina de intercambio de aniones o de cationes (tales como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoco, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende la variante de anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo que utiliza un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a concentración salina baja (p. ej., una sal a partir de aproximadamente 0 a 0,25 M).

5 Formulaciones farmacéuticas

Se pueden preparar formulaciones terapéuticas del polipéptido o anticuerpo para la conservación como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mediante la mezcla del polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes «farmacéuticamente aceptables» optativos que se emplean típicamente en la técnica (que se denominan en conjunto «excipientes»). Por ejemplo, los tamponantes, 10 estabilizantes, conservantes, isotonicantes, detergentes no iónicos, antioxidantes y otro surtido de aditivos (véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, A. Osol, Ed. (1980)). Tales aditivos no deben ser tóxicos para los destinatarios en las dosis y concentraciones empleadas.

Los tamponantes ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Preferiblemente, están presentes a una concentración que oscila de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 15 mM. Los tamponantes idóneos para ser usados con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos, tales como tampones de citrato (p. ej., mezcla de citrato monosódico y citrato disódico, mezcla de ácido cítrico y citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico y citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (p. ej., mezcla de ácido succínico y succinato monosódico, mezcla de ácido succínico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido succínico y succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (p. ej., mezcla de ácido tartárico y tartrato 20 de sodio, mezcla de ácido tartárico y tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico e hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (p. ej., mezcla de ácido fumárico y fumarato monosódico, etc.), tampones de fumarato (p. ej., mezcla de ácido fumárico y fumarato disódico, mezcla de ácido fumárico y fumarato monosódico y fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (p. ej., mezcla de ácido glucónico y gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico y gluconato de 25 potasio, etc.), tampón de oxalato (p. ej., mezcla de ácido oxálico y oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico y oxalato de potasio), tampones de lactato (p. ej., mezcla de ácido láctico y lactato de sodio, mezcla de ácido láctico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico y lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (p. ej., mezcla de ácido acético y acetato de sodio, mezcla de ácido acético e hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, se pueden mencionar tampones de fosfato, tampones de histidina y sales de 30 trimetilamina, tales como Tris.

Se pueden añadir conservantes para retrasar el crecimiento microbiano, y se pueden añadir en cantidades que oscilan del 0,2% al 1% (p/v). Los conservantes idóneos para ser usados con la presente invención incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros (p. ej., 35 cloruro, bromuro, yoduro) de benzalconio, cloruro de hexametonio, parabenos de alquilo tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol.

Los isotonicantes a veces conocidos como «estabilizantes» se pueden añadir para garantizar la isotonicidad de las composiciones líquidas de la presente invención e incluyen alcoholes de azúcares polihídricos, preferiblemente alcoholes de azúcares superiores o trihídricos, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los estabilizantes hacen referencia a una categoría amplia de excipientes que pueden oscilar en función de un agente voluminador a un aditivo que solubiliza el agente terapéutico o ayuda a impedir que se desnaturalice o que se adhiera a la pared del contenedor. Los estabilizantes típicos pueden ser alcoholes de azúcares polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de 40 azúcares, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinositol, galactitol, glicerol y similares, entre ellos ciclitoles, tales como el inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglucolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de baja masa molecular (a saber, < 10 restos); proteínas tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tales como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos tales como lactosa, maltosa, sacarosa y 50 trisacáridos tales como rafinosa; polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizantes pueden estar presentes en el margen de 0,1 a 10.000 pesos por parte del peso de la proteína activa.

Los tensioactivos o detergentes no iónicos (también denominados «humectantes») se pueden añadir para ayudar a solubilizar los agentes terapéuticos, así como para proteger la proteína terapéutica frente a la agregación inducida por la agitación, lo que también permite que la formulación se exponga a tensiones superficiales de cizalla sin que se 55 provoque la desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos idóneos incluyen los polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles Pluronic®, monoéteres de polioxietileno y sorbitano (Tween®-20,

Tween®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en el margen de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.

5 Otro surtido de excipientes incluye los voluminadores (p. ej., almidón), quelantes (p. ej., EDTA), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y cosolventes. La formulación de la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se quiere tratar, preferiblemente los que tienen actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable dar a conocer adicionalmente un agente inmunosupresor. Tales moléculas están idóneamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para los propósitos para los que se diseñaron. Los ingredientes activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante las técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de introducción de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16.^a edición, A. Osal, Ed. (1980).

Las formulaciones para ser usadas para la administración *in vivo* deben estar estériles. Esto se consigue con facilidad, por ejemplo, mediante la filtración a través de membranas de filtración para esterilidad. Se pueden preparar preparaciones de liberación prolongada. Los ejemplos idóneos de preparaciones de liberación prolongada incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la variante de anticuerpo, en donde dichas matrices se encuentran en la forma de artículos conformados, p. ej., películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación prolongada incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de los EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de vinilo-etileno no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico y ácido glucólico, tales como el Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico y ácido glucólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como el acetato de etileno y vinilo, y ácido láctico-ácido glucólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante un espacio de tiempo más breve. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenia. Se pueden concebir estrategias racionales para la estabilización en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es por la formación de un enlace S-S intermolecular a través de intercambios tiodisulfuro, la estabilización se puede conseguir por modificación de los restos sulfhidrilo, mediante la liofilización a partir de soluciones ácidas, mediante el control del contenido de humedad, mediante el uso de los aditivos adecuados, y mediante el desarrollo de composiciones matriciales poliméricas específicas.

La cantidad de polipéptido, anticuerpo o fragmento del mismo terapéutico que será eficaz para el tratamiento de un trastorno o afección en concreto dependerá de la naturaleza del trastorno o de la afección, y se puede determinar mediante las técnicas clínicas estándares. Cuando sea posible, es deseable que se determine la curva de respuesta en función de la dosis y las composiciones farmacéuticas de la invención primero *in vitro* y luego en sistemas modelo de animales, antes de comprobarlo en los humanos.

Preferiblemente, se administra una solución acuosa del polipéptido, anticuerpo o fragmento del mismo terapéutico por inyección subcutánea. Cada dosis puede oscilar de aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 50 µg por kilogramo de masa corporal, o más preferiblemente, de aproximadamente 3 µg a aproximadamente 30 µg por kilogramo de masa corporal.

45 La pauta posológica de la administración subcutánea puede variar desde una vez al mes a diaria, en función de una serie de factores clínicos, entre los que se encuentra el tipo de enfermedad, la intensidad de la enfermedad y la sensibilidad del paciente al fármaco terapéutico.

Usos para la variante de anticuerpo

Las variantes de anticuerpo de la invención se pueden usar como agentes de purificación por afinidad. En este procedimiento, los anticuerpos se inmovilizan sobre una fase sólida, tal como la resina Sephadex™ o un filtro de papel, mediante los métodos bien conocidos en la técnica. La variante de anticuerpo inmovilizada se pone en contacto con una muestra que contiene la diana a purificar y, a partir de entonces, el soporte se lava con un solvente idóneo que retira sustancialmente todo el material de la muestra, salvo la diana a purificar, que está fijada a la variante de anticuerpo inmovilizada. Finalmente, se lava el soporte con otro solvente idóneo, tal como tampón de glicina, que liberará la diana de la variante de anticuerpo.

- Los anticuerpos variantes también pueden ser útiles para los ensayos de diagnóstico, p. ej., para detectar la expresión de una diana de interés en determinadas células, tejidos o suero. Para las aplicaciones diagnósticas, la variante de anticuerpo se marcará típicamente con un grupo detectable. Se dispone de muchas marcaciones. Las técnicas para cuantificar un cambio de fluorescencia están descritas más arriba. El sustrato quimioluminiscente se convierte en excitado desde el punto de vista electrónico debido a una reacción química y puede emitir entonces una luz que se puede medir (con un luminómetro, por ejemplo) o dar energía a un aceptor fluorescente. Ejemplos de marcaciones enzimáticas incluyen las luciferasas (p. ej., la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente de los EE. UU. n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRPO, por su nombre en inglés), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (p. ej., glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan et al., *Methods for the preparation of enzyme-antibody conjugates for use in enzyme immunoassay*, en *Methods in Enzymol.* (Ed. J. Langone y H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73: 147-166 (1981).
- A veces, la marcación se conjuga indirectamente con la variante de anticuerpo. El experto en la técnica tendrá presentes las diferentes técnicas para conseguir esto. Por ejemplo, la variante de anticuerpo se puede conjugar con biotina, y cualquiera de las tres amplias categorías de marcaciones mencionadas más arriba se pueden conjugar con avidina, o viceversa. La biotina se fija selectivamente a la avidina y, así pues, la marcación se puede conjugar con la variante de anticuerpo de esta manera indirecta. Como alternativa, para conseguir la conjugación indirecta de la marcación con la variante de anticuerpo, la variante de anticuerpo se conjuga con un hapteno pequeño (p. ej., digoxina) y uno de los diferentes tipos de marcaciones mencionadas más arriba se conjuga con una variante de anticuerpo antihapteno (p. ej., anticuerpo antidigoxina). Así pues, se puede conseguir la conjugación indirecta de la marcación con la variante de anticuerpo.
- De forma específica, no es necesario marcar la variante de anticuerpo y su presencia se puede detectar con un anticuerpo marcado que se fija a la variante de anticuerpo.
- Los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tal como los ensayos de fijación competitivos, los ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y los ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs. 147-158 (CRC Press, Inc, 1987).
- Los ensayos de fijación competitivos se basan en la capacidad que tiene un estándar marcado para competir por la fijación con la muestra problema ante una cantidad limitada de la variante de anticuerpo. La cantidad de diana en la muestra problema es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se fija a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que se fija, los anticuerpos se insolubilizan por lo general antes o después de la competición. Como resultado, el estándar y la muestra problema que se fijan a los anticuerpos se pueden separar ventajosamente del estándar y la muestra problema que permanece sin fijar.
- Los ensayos de tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de fijarse a una porción inmunógena diferente, o epítopo, o a la proteína a detectar. En un ensayo de tipo sándwich, la muestra problema a analizar está fijada por un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido y después un segundo anticuerpo se fija a la muestra problema, con lo que se forma así un complejo tripartito insoluble. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o se pueden medir con un anticuerpo antiinmunoglobulina que está marcado con un resto detectable (ensayo de tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es una enzima.
- Para la inmunohistoquímica, la muestra de tumor puede ser fresca o congelada, o puede estar incluida en parafina y estar fijada con un conservante, tal como formol, por ejemplo.
- Los anticuerpos también se pueden utilizar para los ensayos diagnósticos *in vivo*. Por lo general, la variante de anticuerpo está marcada con un radionucleótido (tal como, ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S) para poder localizar el tumor con la inmunogammagrafía. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE de alta afinidad de la presente invención se puede utilizar para detectar la cantidad de IgE presente en, p. ej., los pulmones de un paciente asmático.
- El anticuerpo de la presente invención se da a conocer en un kit, a saber, la combinación envasada de reactivos en las cantidades predeterminadas con las instrucciones para realizar el ensayo diagnóstico. Cuando la variante de anticuerpo está marcada con una enzima, el kit puede incluir los sustratos y cofactores necesarios para la enzima (p. ej., un precursor de sustrato que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tamponantes (p. ej., un tampón de bloqueo o tampón de lisis) y similares. La cantidad relativa de los diferentes reactivos se puede variar ampliamente para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se

pueden proporcionar como polvo seco, normalmente liofilizados, que incluyen excipientes que, en disolución, proporcionarán una solución de reactivo que tiene la concentración adecuada.

Usos *in vivo* para el anticuerpo

5 Se contempla que los anticuerpos de la presente invención se puedan utilizar para tratar un mamífero. En una realización, el anticuerpo se prepara para ser administrado a un mamífero no humano con el propósito de obtener datos preclínicos, por ejemplo. Mamíferos no humanos de ejemplo a tratar incluyen primates no humanos, perros, gatos, roedores y otros mamíferos en los que se realizan los estudios preclínicos. Tales mamíferos pueden ser modelos animales establecidos para una enfermedad a tratar con el anticuerpo, o se pueden utilizar para estudiar la toxicidad del anticuerpo de interés. En cada una de estas realizaciones se pueden realizar estudios de escalamiento de la dosis en el mamífero.

10 El anticuerpo o polipéptido se administra mediante cualquier medio idóneo, que incluye la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea para el tratamiento inmunodepresor local, la administración en la lesión. Las infusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, la variante de anticuerpo se administra idóneamente mediante infusión en impulsos, en particular con dosis decrecientes de la variante de anticuerpo. Preferiblemente, la dosis se da en inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

15 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del anticuerpo o polipéptido dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la variante de anticuerpo se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, el tratamiento anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta a la variante del anticuerpo, y el criterio del médico especialista. Los anticuerpos anti-IgE de humano de muy alta afinidad de la invención se pueden administrar idóneamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

20 Según el tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 0,1 mg/kg a 150 mg/kg (p. ej., 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o varias administraciones independientes o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, según los factores mencionados más arriba. Para la administración repetida durante varios días o más, en función de la afección, el tratamiento se prolonga hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de este tratamiento se sigue con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales. Una pauta de dosificación de ejemplo para un anticuerpo anti-LFA-1 o anti-ICAM-1 se describe en la solicitud de patente internacional WO 94/04188.

25 La composición de la variante del anticuerpo se formulará, se dosificará y se administrará de una manera coherente con una buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno concreto que se trata, el mamífero concreto a tratar, la afección clínica de cada paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la pauta de administración y otros factores conocidos por los médicos. La «cantidad terapéuticamente eficaz» de la variante de anticuerpo a administrar estará gobernada por tales consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. La variante de anticuerpo no necesita estar formulada, aunque pueda estarlo facultativamente, con uno o más agentes utilizados en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores explicados más arriba. Estos se utilizan por lo general en las mismas dosis y con las vías de administración que se utilizaron anteriormente o aproximadamente del 1 al 99% de las dosis empleadas anteriormente.

30 Los anticuerpos de la presente invención que reconocen la IgE como su diana se pueden utilizar para tratar «trastornos mediados por IgE». Estos incluyen enfermedades tales como asma, rinitis alérgica y conjuntivitis (fiebre del heno), eccema, urticaria, dermatitis atópica y alergias alimentarias. La afección fisiológica grave del choque anafiláctico ocasionado por, p. ej., picaduras de abeja, mordeduras de serpiente, alimentos o medicación también está englobada por el alcance de esta invención.

Ejemplos

35 Ejemplo 1: Humanización del Acm murino anti-IgE TES-C21

La secuencia de la región variable de la cadena pesada (V_H) y de la región variable de la cadena ligera (V_L) del Acm murino TES-C21 se comparó con las secuencias germinales de anticuerpos de humano disponibles en las bases de datos públicas. Se utilizaron varios criterios al decidir sobre un molde tal y como se describe en la etapa 1 más arriba,

que incluye la longitud total, la posición parecida de la CDR entre las regiones flanqueantes, la homología global, el tamaño de la CDR, etc. Todos estos criterios tomados en conjunto proporcionaron un resultado para elegir el molde óptimo de humano que se muestra en el alineamiento de secuencias entre las secuencias de las cadenas ligera y pesada del Acm TES-C21 y las correspondientes secuencias molde de humano representadas en las figuras 3A y 3B.

En este caso, se utilizó más de un molde de región flanqueante de humano para diseñar este anticuerpo. El molde de humano elegido para la cadena V_H era una combinación de DP88 (restos aminoacídicos 1 a 95) y JH4b (restos aminoacídicos 103 a 113) (véase la figura 3B). El molde de humano elegido para la cadena V_L era una combinación de L16 (VK subgrupo III, restos aminoacídicos 1 a 87) en combinación con JK4 (restos aminoacídicos 98 a 107) (véase la figura 3A). La homología de la región flanqueante entre la secuencia murina y el molde de humano era de aproximadamente el 70% para V_H y de aproximadamente el 74% para V_L .

Una vez que se eligió el molde, se construyó una genoteca de Fab mediante la síntesis de ADN y la PCR solapante como se describe más arriba y se representa en la figura 2. La genoteca estaba compuesta por las CDR de TES-C21 sintetizadas con los moldes de humano correspondientes que se eligieron, DP88/JH4b y L16/JK4. La complejidad de la genoteca era de 4096 ($= 2^{12}$). Los nucleótidos solapantes que codifican las secuencias parciales de V_H y V_L se sintetizaron en el margen de aproximadamente 63 a aproximadamente 76 nucleótidos con 18 a 21 nucleótidos solapantes.

La amplificación por PCR del gen de V_L y V_H se realizó con un cebador directo biotinilado que contenía la secuencia específica de la región flanqueante FR1 y una secuencia protuberante hibridada al extremo de la secuencia líder (GenIII) y un cebador inverso de la región constante conservada (C κ o CH1) en condiciones de PCR estándares. El producto de la PCR se purificó por electroforesis en gel de agarosa, o mediante el kit comercial de purificación para PCR, para retirar los cebadores biotinilados sin incorporar y la PCR inespecífica.

La fosforilación en 5' del producto de la PCR se realizó con 2 μ g del producto de la PCR, 1 μ l de la polinucleótido cinasa de T4 (10 unidades/ μ l), 2 μ l del tampón PNK a 10 \times , 1 μ l de ATP a 10 mM en un volumen total de 20 μ l ajustado con ddH₂O. Después de la incubación a 37 °C durante 45 minutos y la desnaturalización térmica a 65 °C durante 10 min, el volumen de reacción se ajustó a 200 μ l mediante la adición de ddH₂O para la siguiente etapa.

Los 100 μ l de perlas magnéticas revestidas con estreptavidina se lavaron dos veces con 200 μ l de tampón B&W a 2 \times y se resuspendieron en 200 μ l de tampón B&W a 2 \times . El producto de PCR fosforilado se mezcló con las perlas y se incubó a temperatura ambiente (TA) durante 16 min con una agitación suave.

Las perlas se sedimentaron y lavaron dos veces con 200 μ l de tampón B&W a 2 \times . El ADN monocatenario sin biotinilar (cadena negativa) se eluyó con 300 μ l de NaOH a 0,15 M recién preparado a TA durante 10 min con agitación suave. Una segunda elución con NaOH puede incrementar ligeramente el rendimiento (optativo). El eluyente se centrifugó para retirar cualquier resto de perlas.

El ADN monocatenario se precipitó desde el sobrenadante por la adición de 1 μ l de glucógeno (10 mg/ml), 1/10 del volumen de NaOAc a 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de EtOH. A continuación, el ADN monocatenario precipitado se lavó con EtOH al 70%, después se liofilizó durante 3 min y se disolvió en 20 μ l de ddH₂O. El ADN monocatenario se cuantificó mediante depósitos puntuales en una placa de agarosa con bromuro de etidio (EtBr) con estándares de ADN, o por la medición de la DO₂₆₀.

Ejemplo 2: Clonación de V_H y V_L en un vector de expresión para fagos

Se clonaron las V_H y V_L en un vector de expresión para fagos mediante mutagénesis por hibridación. Los moldes uridinilados se prepararon mediante la infección de la cepa de *E. coli* CJ236 (*dut⁻ ung⁻*) con el fago basado en M13 (vector de expresión para fagos) TN003.

Se hibridaron (a una proporción molar de aproximadamente 8 veces de inserto por vector) los siguientes componentes [200 ng del vector para fagos uridinilado (8,49 kb); 92 ng de cadena H monocatenaria fosforilada (489 bases); 100 ng de cadena L monocatenaria fosforilada (525 bases); 1 μ l de tampón de hibridación a 10 \times ; ajuste del volumen con ddH₂O hasta 10 μ l] por PCR manteniendo la temperatura a 85 °C durante 5 min (desnaturalización) y a continuación llevándola paulatinamente a 55 °C durante 1 hora. Las muestras se enfriaron en hielo.

Al producto hibridado se le añadieron los siguientes componentes: 1,4 μ l de tampón de síntesis a 10 \times ; 0,5 μ l de ADN ligasa de T4 (1 unidad/ μ l); 1 μ l de ADN polimerasa de T4 (1 unidad/ μ l), y a esto le siguió la incubación en hielo durante 5 min y a 37 °C durante 1,5 horas. A continuación, el producto se precipitó con etanol y se disolvió en 10 μ l de ddH₂O o TE.

El ADN se digirió con 1 μ l de *Xba*I (10 unidades/ μ l) durante 2 h y se inactivó con calor a 65 °C durante 20 min. El

ADN digerido se transfectó en 50 μ l de células DH10B electrocompetentes mediante electroporación. El fago resultante se tituló haciéndolo crecer en un césped bacteriano de XL-1Blue a 37 °C durante una noche. Los clones se secuenciaron para confirmar la composición.

Ejemplo 3: Cultivo en pocillos profundos para el cribado de la genoteca

5 A. Siembra en placas de la genoteca en fagos

La genoteca en fagos se diluyó en el medio LB para conseguir el número deseado de calvas por placa. El fago de titulación alta se mezcló con 200 μ l de cultivo de células XL-1B. Se mezcló con 3 ml de agar de cobertera en LB, se vertió sobre una placa de LB y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. La placa se incubó durante una noche a 37 °C.

10 B. Elución de los fagos

Se añadieron 100 μ l del tampón de elución de fagos (Tris-Cl a 10 mM, pH 7,5, EDTA a 10 mM, NaCl a 100 mM) a cada pocillo de una placa estéril de 96 pocillos con fondo en U. Mediante una punta de pipeta con filtro, se transfirió a cada pocillo una única calva de fago desde la placa de la genoteca que estuvo en crecimiento durante una noche. La placa de elución de fagos se incubó a 37 °C durante 1 hora. La placa se puede conservar a 4 °C después de la incubación.

15

C. Cultivo para placas de pocillos profundos

Las células XL1B de un cultivo de 50 ml se añadieron al medio YT a 2 \times a una dilución 1:100. Las células se hicieron crecer a 37 °C en un agitador hasta que la A_{600} estaba entre 0,9 y 1,2.

D. Infección con el fago en las placas de pocillos profundos

20 Cuando las células alcanzaron la DO adecuada, se le añadió IPTG a 1 M (1:2.000) al cultivo de XL1B. La concentración final de IPTG era de 0,5 mM. Se transfirieron 750 μ l del cultivo celular a cada pocillo a partir de una placa de 96 pocillos profundos (Fisher Scientific). Cada pocillo se inoculó con 25 μ l del fago eluido. La placa de pocillos profundos se colocó en un agitador (250 rpm) y se incubó durante una noche a 37 °C.

E. Preparación del sobrenadante para el cribado por ELISA

25 Después de la incubación, las placas de pocillos profundos se centrifugaron a 3.250 rpm durante 20 minutos con el rotor para placas JA-5.3 de Beckman. Se extrajeron 50 μ l del sobrenadante de cada pocillo para ELISA.

F. Inoculación de cultivos líquidos de 15 ml de células XL-1

30 Las células XL-1 se hicieron crecer a 37 °C en el agitador (250 rpm) en YT a 2 \times que contenía 10 μ g/ml de tetraciclina hasta que la A_{600} = 0,9 a 1,2. Se les añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se transfirieron 15 ml del cultivo a un tubo cónico de 50 ml para cada clon a caracterizar. Las células se inocularon con 10 μ l del fago de la reserva de titulación alta (titulación = $\sim 10^{11}$ ufp/ml) y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las células se hicieron crecer durante una noche a temperatura ambiente con agitación.

G. Aislamiento del Fab soluble desde el periplasma

35 Las células se sedimentaron en una centrifuga IEC a 4.500 rpm durante 20 minutos. Se retiró el medio de cultivo, se resuspendió el sedimento en 650 μ l de tampón de resuspensión (Tris a 50 mM, pH 8,0, que contiene EDTA a 1 mM y sacarosa a 500 mM), se agitó vorticialmente y se colocó en hielo durante 1 hora con agitación suave. Los residuos celulares se retiraron por centrifugación a 9.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contiene los Fab solubles se recogió y se conservó a 4 °C.

Ejemplo 4: Modificación de las regiones flanqueantes

40 Había doce restos vacilantes murino/humano dentro de las regiones flanqueantes en las posiciones posiblemente clave descritas más arriba. La posición 73 de V_H se mantuvo como el resto murino treonina en la genoteca de humanización porque esta posición se determinó que afectaba a la fijación. Sin embargo, se observó que la treonina en 73 de la V_H es un resto humano habitual en el subgrupo 1 y 2 de la V_H germinal de humano.

45 Los restos flanqueantes que diferían entre la secuencia de TES-C21 y el molde de humano se sustituyeron aleatoriamente tal y como se describe más arriba, y a continuación se les valoró su posible efecto sobre la fijación a la diana y el plegamiento del anticuerpo. Se identificaron los restos flanqueantes que posiblemente pudieron haber afectado a la fijación. En este caso, eran los restos 12, 27, 43, 48, 67, 69 de V_H y 1, 3, 4, 49, 60, 85 de V_L (sistema

de numeración de Kabat) (véase la figura 4). Luego se demostró que sólo las posiciones 27 y 69 alteraban significativamente la fijación de la región de V_H (número de clon 1136-2C).

El cribado primario utilizado fue un ELISA de un solo punto (SPE, por su nombre en inglés) mediante el uso de los medios de cultivo (véase la descripción a continuación). El cribado primario seleccionó clones que se fijaban a la molécula diana del anticuerpo. Los clones que daban una señal igual o mejor que la molécula original se seleccionaron para la siguiente ronda de cribado.

En la segunda ronda de cribado, cada fago se hizo crecer en un cultivo bacteriano de 15 ml y se utilizaron las preparaciones periplásmicas para el SPE y los ensayos de titulación de ELISA. Los clones que conservaban una fijación más alta en este ensayo se caracterizaron adicionalmente. Una vez que todos los clones primarios seleccionados se habían procesado, se secuenciaron el primer 10-15% de los clones y los clones se distribuyeron de acuerdo con la secuencia. Los representantes de cada grupo de secuencias se compararon unos con los otros y se seleccionaron los mejores clones. Se combinaron las secuencias de estos clones elegidos y se evaluaron los efectos de las diferentes combinaciones.

La genoteca construida se sometió a un cribado por ELISA en busca de la fijación mejorada por la IgE de humano recombinante, SE44. Se aislaron y se secuenciaron los clones con mayor afinidad de fijación que el Fab de TES-C21 murino. Se caracterizaron adicionalmente los clones de ID n.º 4, 49, 72, 76 y 136. Las curvas de titulación por ELISA para los clones 4, 49, 72, 78 y 136 se muestran en las figuras 5A y 5B, que indican que su afinidad es parecida a la del TES-C21 madre. Estos clones compiten con el TES-C21 murino por la fijación a la IgE de humano, lo que indica que el epítipo de fijación no había cambiado durante el proceso de humanización. Los Fab humanizados no se fijaron a la IgE fijada al FcεRI, lo que sugiere que es menos probable que los anticuerpos humanizados reaccionen de forma cruzada con el receptor y provoquen la liberación de histamina cuando se construyan en IgG divalentes.

El clon 136 humanizado conservaba 5 restos flanqueantes de la cadena pesada murinos (= homología con la región flanqueante de V_H de humano del 94,3%) con una región flanqueante de la cadena ligera 100% humana seleccionada por maduración de afinidad. Se demostró que el Fab humanizado inhibía la fijación de la IgE al FcεRI (figura 6).

Ejemplo 5: Protocolo de ELISA de un solo punto (SPE) para cribar los anti-IgE

Las placas se revistieron con el anti-Fd de humano de oveja a 2 µg/ml en tampón de revestimiento de carbonato durante una noche a 4 °C. Se retiró la solución de revestimiento y las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de SAB al 3% en PBS durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar las placas 4 veces con PBS/TWEEN® al 0,1% (PBST), se añadió la muestra de Fab a 50 µl/pocillo (a saber, el sobrenadante que contiene un fago en alta titulación y el Fab secretado o la preparación periplásmica desde el bloque de DMB, o la preparación de 15 ml). Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y después se lavaron 4 veces con PBST. A continuación se le añadieron 50 µl/pocillo de SE44 biotinilado a 0,015 µg/ml diluido en SAB al 0,5% en PBS, y TWEEN® al 0,05%. Las placas se incubaron entonces durante 2 horas a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBST. Se le añadió estreptavidina-HRP a 50 µl/pocillo, dilución 1:2.000 en SAB al 0,5% en PBS, y TWEEN® al 0,05%, y las placas se incubaron 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con PBST. Se añadió el TMB de sustrato (Sigma) a 50 µl/pocillo para el revelado y a continuación se paró con la adición de 50 µl/pocillo de H₂SO₄ a 0,2 M.

Ejemplo 6: Titulación por ELISA: anti-IgE

Las placas se revistieron con 0,25 µg/ml de SE44 (para 0,1 µg/ml de Fab purificado) en tampón de revestimiento de carbonato durante una noche a 4 °C. Se retiró la solución de revestimiento y las placas se bloquearon con 200 µl/pocillo de SAB al 3% en PBS durante 1 hora a 37 °C.

Las placas se lavaron 4 veces con PBS/TWEEN® al 0,1% (PBST). Se les añadieron 50 µl/pocillo de Fab (de una preparación periplásmica de 15 ml) comenzando con una dilución de 1:2 y diluyendo en serie a 1/3 en SAB al 0,5% en PBS y TWEEN® 20 al 0,05%. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron 4 veces con PBST y se les añadieron 50 µl/pocillo, dilución 1:1.000 (0,8 µg/ml) de anti-Fd de humano de oveja con biotina en SAB al 0,5% en PBS y TWEEN® 20 al 0,05%. Las placas se incubaron de nuevo durante 2 horas a temperatura ambiente.

Después de 4 lavados con PBST, se les añadió 50 µl/pocillo a dilución 1:2.000 de Neutra-avidina-AP (0,9 µg/ml) en SAB al 0,5% en PBS y TWEEN® 20 al 0,05%, y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Las placas se lavaron 4 veces con PBST. Y se revelaron por la adición de 50 µl/pocillo del sustrato pNPP. El revelado se paró con la adición de 50 µl/pocillo de NaOH a 3 M. La absorbancia de cada pocillo se leyó a 405 nm o a

410 nm.

Ejemplo 7: Protocolo para la purificación de afinidad del Fab soluble expresado en el fago M13

DÍA 1

- 5 Dos cultivos de 500 ml (YT a 2×) que contienen tetraciclina a 10 mg/ml se inocularon con 5 ml de una reserva de XL1B durante una noche y se hicieron crecer a 37 °C hasta $A_{600} = 0,9$ a 1,2. Se les añadió IPTG a una concentración de 0,5 mM. A continuación, el cultivo celular se infectó con 200 μ l de fago por cultivo y se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Después de la infección, las células se hicieron crecer a 25 °C durante una noche con agitación.

DÍA 2

- 10 Las células se sedimentaron a 3500g durante 30 minutos a 4 °C en tubos de centrifuga de 250 ml. Se aspiró el medio de cultivo y los sedimentos se resuspendieron en un total de 12 a 15 ml de tampón de lisis (cóctel del inhibidores de proteasas + tampón A).

Tampón A: (1 litro)

NaH₂PO₄ a 50 mM 6,9 g de NaH₂PO₄·H₂O (o 6 g de NaH₂PO₄)

NaCl a 300 mM 17,54 g de NaCl

- 15 Imidazol a 10 mM 0,68 g de imidazol (MM 68,08)

Ajustar el pH a 8,0 con NaOH

Tampón de lisis:

Mezclar 25 ml del tampón A con un comprimido del cóctel de inhibidores de proteasas completo (Roche, Basilea, Suiza).

- 20 Las células resuspendidas se transfirieron a un tubo cónico de 50 ml y se lisaron con 100 μ l de lisozima a 100 mg/ml mediante la inversión del tubo repetidas veces hasta que la mezcla se mueve al unísono como una masa informe (debido a la lisis). Las células se rompieron con ultrasonidos en hielo, después se les añadieron 10 μ l de ADNasa I (aproximadamente 1.000 unidades), y se meció con suavidad a 4 °C durante 30 minutos. Los residuos se sedimentaron por centrifugación a 12000g durante 30 minutos a 4 °C, utilizando tubos de centrifuga de 50 ml. Los sobrenadantes se transfirieron a un nuevo tubo cónico y se conservaron a 4 °C.

- 25 Se utilizó agarosa Ni-NT (Qiagen, Valencia, CA) para purificar los Fab solubles de acuerdo con el protocolo del fabricante. El lisado se mezcló con Ni-NTA y se cargó en una columna. El flujo continuo se recogió para el análisis por SDS-PAGE. La columna se lavó con 20 ml de tampón (NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 300 mM, imidazol a 15 mM, ajustar el pH a 8,0 con NaOH) seguido de un lavado con 20 ml de NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 300 mM e imidazol a 20 mM. Los Fab se eluyeron con 6 × 500 μ l de tampón de elución (NaH₂PO₄ a 50 mM, NaCl a 300 mM, imidazol a 450 mM, ajustar el pH a 8,0 con NaOH) y se analizaron por SDS-PAGE. Las fracciones de la columna se conservaron a 4 °C. Las fracciones de la columna se analizaron por SDS-PAGE y se seleccionó la fracción con la mayor cantidad de Fab y se dializó en PBS a 4 °C.

- Ejemplo 8: Ensayo del receptor soluble
- 35 Una placa de ensayo de 96 pocillos idónea para ELISA se revistió con 0,05 ml del tampón de revestimiento con la cadena α del receptor Fc ϵ RI a 0,5 μ g/ml (carbonato/bicarbonato a 50 mM, pH 9,6) durante 12 horas a 4-8 °C. Los pocillos se aspiraron y se les añadió 250 μ l de tampón de bloqueo (PBS, SAB al 1%, pH 7,2) y se incubó durante 1 hora a 37 °C. En una placa de ensayo distinta, las muestras y los Acm TES-C21 de referencia se titularon de 200 a 0,001 μ g/ml mediante diluciones de 1:4 con el tampón de ensayo (SAB al 0,5% y Tween 20 al 0,05%, PBS, pH 7,2) y se le añadió un volumen igual de IgE biotinilada a 100 ng/ml, y la placa se incubó durante 2 o 3 horas a 25 °C. Los pocillos revestidos con Fc ϵ RI se lavaron tres veces con PBS y TWEEN 20 al 0,05%, y se transfirieron 50 μ l de los pocillos de la muestra y se incubaron con agitación durante 30 minutos a 25 °C.

- 45 Se incubaron 50 μ l/pocillo de estreptavidina-HRP a 1 mg/ml, diluida 1:2.000 en tampón de ensayo, durante 30 minutos con agitación y a continuación la placa se lavó como antes. Se le añadieron 50 μ l/pocillo del sustrato TMB y se reveló el color. La reacción se detuvo con la adición de un volumen igual de H₂SO₄ a 0,2 M y se midió la absorbancia a 450 nm.

Ejemplo 9: Fijación de los anticuerpos al Fc ϵ RI cargado con IgE

La fijación del anticuerpo a la IgE de humano asociada a la subunidad α del Fc ϵ RI se determinó mediante la incubación previa con la IgE de humano a 10 μ g/ml durante 30 min a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces y después se incubaron durante una hora con diferentes concentraciones de los Acm murinos anti-IgE de humano E-10-10 o la variante humanizada de Fab. La fijación de los Fab se detectó con un anticuerpo anti-Fd de humano marcado con biotina seguido de SA-HRP. El Ac murino E10-10 se detectó mediante el Ac de cabra anti-Fc de Ig murina conjugado a HRP.

5

Ejemplo 10 Caracterización de clones

A cada candidato se le ensayó la afinidad de fijación y se secuenciaron los clones positivos. Las variantes de anticuerpo que tienen mutaciones beneficiosas en las regiones CDR que incrementan la afinidad de fijación se caracterizaron adicionalmente. Los ensayos incluían el análisis por Biacore; la inhibición de la fijación de la IgE a su receptor; y la fijación cruzada de la IgE fijada al receptor.

10

Se creó una genoteca de variantes. Las secuencias aminoacídicas de las diferentes CDR que mostraban una mejora de la afinidad se describen en la tabla 1. En la figura 7 se presentan los candidatos de alta afinidad que tienen combinaciones de sustituciones.

15 TABLA 1.

CDRL1:		CDRH1:	
P RASQSIGTNIH	SEQ ID n.º 5	P MYWLE	SEQ ID n.º 15
#1 RASRSIGTNIH	SEQ ID n.º 6	#1 WYWLE	SEQ ID n.º 16
#2 RASQRIGTNIH	SEQ ID n.º 7	#2 YYWLE	SEQ ID n.º 17
CDRL2:		CDRH2:	
P YASESIS	SEQ ID n.º 8	P EISPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID n.º 18
#1 YAYESIS	SEQ ID n.º 9	#1 EIEPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID n.º 19
#2 YASESIY	SEQ ID n.º 10	#2 EIDPGTFTTNYNEKFKA	SEQ ID n.º 20
#3 YASESDS	SEQ ID n.º 11	#3 EISPDFTTNYNEKFKA	SEQ ID n.º 21
#4 YASESES	SEQ ID n.º 12	#4 EISPETFTTNYNEKFKA	SEQ ID n.º 22
CDRL3:		#5 EISPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID n.º 23
P QQSWSWPTT	SEQ ID n.º 13	#6 EIEPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID n.º 24
#1 QQSWSWPTT	SEQ ID n.º 14	#7 EIDPGTFETNYNEKFKA	SEQ ID n.º 25
		CDRH3:	
		P FSHFSGSNYDYFDY	SEQ ID n.º 26
		#1 FSHFSGMNYDYFDY	SEQ ID n.º 27
		#2 FSHFSGQNYDYFDY	SEQ ID n.º 28
		#3 FSHFTGSNYDYFDY	SEQ ID n.º 29

P = madre (original)

En la figura 9 se presentan 19 variantes de la cadena pesada y en la figura 8 se presentan 35 variantes de la cadena ligera. A 3 candidatos se les caracterizó adicionalmente la afinidad de fijación y se presentan en la tabla 2.

20 TABLA 2: Afinidad de fijación

Acm	Kd	Veces que se incrementa la afinidad de fijación
TES-C21	614 \pm 200 pM	
Acm 1 (CL-5A)	0,158 pM	3886

Acm	Kd	Veces que se incrementa la afinidad de fijación
Acm 2 (CL-2C)	1,47 ± 0,5 pM	417
Acm 3 (CL-5I)	3,2 ± 2,2 pM	191

Ejemplo 11 Expresión y purificación de los anticuerpos anti-IgE y conjugación a la HRP

Se generaron los candidatos de los Acm de alta afinidad. Para la generación de los Acm anti-IgE intactos, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada se amplificaron por PCR a partir de los moldes en vectores fágicos y se subclonaron por separado en vectores de expresión de cadena L y H bajo la expresión de un promotor de CMV. Se construyeron seis clones de anticuerpo y se representan en la figura 10 A-F. Los plásmidos de las cadenas ligera y pesada adecuadas se cotransfectaron en la línea de células de mieloma de ratón NS0 por electroporación mediante los métodos bien conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Liou et al. *J. Immunol.* 143 (12): 3967-75 (1989). Los anticuerpos se purificaron de cada sobrenadante de las líneas celulares estables con el uso de la proteína A unida a Sepharose (Pharmacia). La concentración del anticuerpo se determinó en un espectrofotómetro a 280 nm y un ensayo de citopresión fluorescente (IDEXX).

Los anticuerpos purificados se conjugaron a la peroxidasa de rábano picante (HRP) mediante el kit de conjugación de peroxidasa (Zymed Labs, San Francisco, CA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La titulación de cada Acm anti-IgE se determinó por ELISA con placas revestidas con una IgE monoclonal de humano (SE44).

Se depositaron los siguientes cultivos en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas Va. 20110-2209 EE. UU. (ATCC):

Hibridoma	ATCC n.º	Fecha de depósito
CL-2C anti-IgE	PTA-5678	3 de diciembre de 2003
CL-5A anti-IgE	PTA-5679	3 de diciembre de 2003
CL-5I anti-IgE	PTA-5680	3 de diciembre de 2003

Este depósito se realizó bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes (Tratado de Budapest) y la normativa derivada de él. Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable durante 30 años desde la fecha del depósito. El organismo estará disponible en la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, que garantiza la disponibilidad permanente y sin restricciones de la progenie del cultivo para el público tras la emisión de la patente pertinente.

El beneficiario de la presente solicitud ha acordado que si el cultivo en depósito se muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones idóneas, se reemplazará rápidamente tras la notificación con un espécimen viable del mismo cultivo. La disponibilidad de la cepa depositada no se debe interpretar como una licencia para poner en práctica la invención contraviniendo los derechos concedidos por la autoridad de cualquier gobierno conforme a sus leyes sobre patentes.

Los puntos preferidos descritos en la presente memoria se describen a continuación y se mencionan como realización E1 a realización E55.

E1. Una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia aminoacídica que tiene la fórmula: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4, en donde FRL1 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 30 a 37; CDRL1 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 5 a 7; FRL2 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 38 a 39; CDRL2 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 8 a 12; FRL3 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 40 a 43; CDRL3 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 13 a 14; y FRL4 consiste en la SEQ ID n.º 44.

E2. La región variable de la cadena ligera de E1, que comprende cualquiera de las SEQ ID n.ºs 57, 61, 63, 65, 67 y 69.

E3. La región variable de la cadena ligera de E1, que además comprende una región constante.

E4. La región variable de la cadena ligera de E3, en donde el dominio constante tiene la SEQ ID n.º 58.

ES 2 566 778 T3

- E5. La región variable de la cadena ligera de E2, que además comprende una región constante.
- E6. La región variable de la cadena ligera de E5, en donde la región constante tiene la SEQ ID n.º 58.
- E7. La región variable de la cadena ligera de E1, que además comprende un péptido señal.
- E8. La región variable de la cadena ligera de E7, en donde el péptido señal tiene la SEQ ID n.º 56.
- 5 E9. Una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia aminoacídica que tiene la fórmula: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4, en donde FRH1 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 45 a 46; CDRH1 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 15 a 17; FRH2 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 47 a 50; CDRH2 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 18 a 25; FRH3 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 51 a 54; CDRH3 consiste en cualquiera de las SEQ ID n.ºs 26 a 29; y FRH4 consiste en la SEQ ID n.º 55.
- 10 E10. La región variable de la cadena pesada de E9, que comprende cualquiera de las SEQ ID n.ºs 59, 62, 64, 66, 68 y 70.
- E11. La región variable de la cadena pesada de E7, que además comprende al menos el dominio CH1 de una región constante.
- 15 E12. La región variable de la cadena pesada de E11, que comprende los dominios CH1, CH2 y CH3 de una región constante.
- E13. La región variable de la cadena pesada de E11, en donde la región constante es de un anticuerpo IgG.
- E14. La región variable de la cadena pesada de E13, en donde el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3 o un anticuerpo IgG4.
- E15. La región variable de la cadena pesada de E13, en donde el dominio constante tiene la SEQ ID n.º 60.
- 20 E16. La región variable de la cadena pesada de E10, que además comprende una región constante.
- E17. La región variable de la cadena pesada de E16, en donde el dominio constante tiene la SEQ ID n.º 60.
- E18. La región variable de la cadena pesada de E9, que además comprende un péptido señal.
- E19. La región variable de la cadena pesada de E19, en donde el péptido señal tiene la SEQ ID n.º 56.
- 25 E20. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región variable de la cadena ligera de E1, en donde el anticuerpo se fija específicamente a IgE.
- E21. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que comprende la región variable de la cadena pesada de E9, en donde el anticuerpo se fija específicamente a IgE.
- E22. El anticuerpo de E20, que comprende una región de la cadena pesada de E9.
- 30 E23. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 57 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 59.
- E24. El anticuerpo de E23, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.
- 35 E25. El anticuerpo de E24, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.
- E26. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 61 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 62.
- 40 E27. El anticuerpo de E26, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.
- E28. El anticuerpo de E27, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica

presentada en la SEQ ID n.º 60.

E29. El anticuerpo de E26, que se produce en una célula que tiene el número de depósito de ATCC PTA-5678.

5 E30. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 63 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 64.

E31. El anticuerpo de E30, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.

10 E32. El anticuerpo de E31, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.

E33. El anticuerpo de E30, que se produce en una célula que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-5680.

E34. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 65 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 66.

15 E35. El anticuerpo de E34, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.

E36. El anticuerpo de E35, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.

20 E37. El anticuerpo de E34, que se produce en una célula que tiene el número de depósito de la ATCC PTA-5679.

E38. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 67 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 68.

25 E39. El anticuerpo de E38, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.

E40. El anticuerpo de E39, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.

30 E41. El anticuerpo de E22, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 69 y una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 70.

E42. El anticuerpo de E41, que además comprende una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.

35 E43. El anticuerpo de E42, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.

E44. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de E20 o E21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

E45. El anticuerpo de E20 o E21, unido además a una marcación.

40 E46. Un kit de diagnóstico que comprende un anticuerpo de E20 o E21.

E47. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de E22.

E48. Una célula que comprende el vector de E47.

E49. La célula de E48, en donde la célula tiene el número de depósito de la ATCC PTA-5678, PTA-5679 o PTA-5680.

- E50. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula de E48 en las condiciones adecuadas para producir un anticuerpo y aislar el anticuerpo producido.
- 5 E51. Un método para medir la cantidad de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con un anticuerpo de E22; y determinar el nivel de retención del anticuerpo por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel más alto o más bajo de retención del anticuerpo por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene una cantidad más alta o más baja de moléculas de IgE con respecto a la del sujeto de control.
- 10 E52. Un método para diagnosticar un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con un anticuerpo de E22; y determinar el nivel de retención del anticuerpo por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel más alto o más bajo de retención del anticuerpo por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE.
- 15 E53. El método de E52, en donde el trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE es asma, rinitis alérgica, eccema, urticaria o dermatitis atópica.
- E54. Un método para tratar un trastorno asociado a una cantidad de IgE anómalamente elevada en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de E22, de tal manera que el trastorno está tratado en el sujeto.
- 20 E55. El método de E54, en donde el trastorno es asma, rinitis alérgica, eccema, urticaria, dermatitis atópica o una alergia alimentaria.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> TANOX, INC. SINGH, Sanjaya FOSTER, Catherine WU, Herren
- 5 <120> Anticuerpos anti-IgE de humano de alta afinidad
- <130> TNX-1010 (2) PCT
- <140> PCT/US2004/002894
- 10 <141>02-02- 2004
- <150> 60/444,229
- <151>01-02- 2003
- <160> 70
- 15 <170> PatentIn versión 3.4
- <210> 1
- <211> 107
- 20 <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <220>
- <221> característica miscelánea
- 25 <223> CADENA LIGERA DE TES-C21
- <400> 1
- Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
- Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
- Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
- Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
- Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
- Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95
- Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
- 30 <210> 2
- <211> 107
- <212> PRT
- 35 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> molde de la secuencia de consenso de la cadena ligera de L16/-JK4 humano
- 40

ES 2 566 778 T3

<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

- 5 <210> 3
- <211> 123
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

- 10 <220>
- <221> característica miscelánea
- <223> Cadena pesada de TES-C21

<400> 3

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

- 15 Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115 120

- 20 <210> 4
- <211> 113

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
5 <221> característica miscelánea
<223> molde de la secuencia de consenso de la cadena pesada de DP88/JH4b humano

<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Phe Asp Tyr Leu Val Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser
100 105 110

10 Ser
<210> 5
<211> 11
<212> PRT
15 <213> ARTIFICIAL

<220>
<223> SECUENCIA DE TES-C21 CDRL1 (TABLA 1)

20 <400> 5
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 6
<211> 11
25 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
<223> SECUENCIA Nº 1 DE LA VARIANTE CDRL1 (TABLA 1)

30 <400> 6
Arg Ala Ser Arg Ser Ile Gly Thr Asn Ile His
1 5 10

<210> 7
35 <211> 11
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SECUENCIA N° 2 DE LA VARIANTE CDRL1 (TABLA 1)

5 <400> 7
 Arg Ala Ser Gln Arg Ile Gly Thr Asn Ile His
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> SECUENCIA DE TES-C21 CDRL2 (TABLA 1)

15 <400> 8
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 9
 20 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 25 <223> VARIANTE N°1 DE CDRL2 (TABLA 1)

<400> 9
 Tyr Ala Tyr Glu Ser Ile Ser
 1 5

30 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>
 <223> VARIANTE N°2 DE CDRL2 (TABLA 1)

<400> 10
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Tyr
 1 5

40 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> VARIANTE N°3 DE CDRL2 (TABLA 1)

<400> 11
 Tyr Ala Ser Glu Ser Asp Ser
 1 5

50 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE N°4 DE CDRL2 (TABLA 1)

<400> 12

Tyr Ala Ser Glu Ser Glu Ser
1 5

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> TES-C21 CDRL3 (TABLA 1)

<400> 13

Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

15

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

20

<220>

<223> VARIANTE CDRL3 (TABLA)

25

<400> 14

Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

30

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> TES-C21 CDRH1

35

<400> 15

Met Tyr Trp Leu Glu

1

5

40

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

45

<220>

<223> VARIANTE N°1 DE CDRH1 (TABLA 1)

<400> 16

Trp Tyr Trp Leu Glu
1 5

50

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

55

<220>

<223> CDRH1 N°2 (TABLA 1)

<400> 17
 Tyr Tyr Trp Leu Glu
 1 5

5 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> TES-C21 CDRH2 (TABLA 1)

<400> 18
 Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

15 Ala

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> VARIANTE N°1 DE CDRH2 (TABLA 1)

<400> 19
 Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

25 Ala

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT

30 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE N°2 DE CDRH2 (TABLA 1)

35 <400> 20
 Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 21
 <211> 17
 <212> PRT

40 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE N°3 DE CDRH2 (TABLA 1)

45 <400> 21
 Glu Ile Ser Pro Asp Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Ala

<210> 22
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <220>
 <223> VARIANTE N°4 DE CDRH2 (TABLA 1)
 <400> 22
 Glu Ile Ser Pro Glu Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 10 Ala
 <210> 23
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> VARIANTE N°5 DE CDRH2 (TABLA 1)
 20 <400> 23
 Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 24
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> VARIANTE N°6 DE CDRH2 (TABLA 1)
 30 <400> 24
 Glu Ile Glu Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 25
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> VARIANTE N°7 DE CDRH2 (TABLA 1)
 40 <400> 25
 Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Glu Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Ala
 <210> 26
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 45

<220>
 <223> TES-C21 CDRH3 (TABLA 1)

5 <400> 26
 Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE N°1 DE CDRH3 (TABLA 1)

15 <400> 27
 Phe Ser His Phe Ser Gly Met Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> VARIANTE N°2 DE CDRH3 (TABLA 1)

<400> 28
 Phe Ser His Phe Ser Gly Gln Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

30 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>
 <223> VARIANTE N°3 DE CDRH3 (TABLA 1)

<400> 29
 Phe Ser His Phe Thr Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

40 <210> 30
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> VARIANTE 136 DE FRL1

<400> 30
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

50 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 31
 <211> 23
 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE 1 DE FRL1

5 <400> 31
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

10 <210> 32
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 15 <223> VARIANTE 2 DE FRL1

<400> 32
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

20 <210> 33
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

25 <220>
 <223> VARIANTE 4 DE FRL1

<400> 33
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

30 <210> 34
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

35 <220>
 <223> VARIANTE 13 DE FRL1

<400> 34
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

40 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 35
 <211> 23
 <212> PRT
 45 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 18 DE FRL1

<400> 35

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

5 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 36

<211> 23

<212> PRT

10 <213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 25 DE FRL1

15 <400> 36

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 37

<211> 23

20 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> VARIANTE 27 DE FRL1

25 <400> 37

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 38

30 <211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

35 <223> VARIANTE 136 DE FRL2

<400> 38

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

40 <210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

45 <220>

<223> VARIANTE 1 DE FRL2

<400> 39

ES 2 566 778 T3

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Lys
 1 5 10 15
 <210> 40
 <211> 32
 5 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 <223> VARIANTE 136 DE FRL3
 10 <400> 40
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 41
 <211> 32
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 <220>
 20 <223> VARIANTE 1 DE FRL3
 <400> 41
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 25 <210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 30 <220>
 <223> VARIANTE 13 DE FRL3
 <400> 42
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 35 <210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 40 <220>
 <223> VARIANTE 18 DE FRL3
 <400> 43
 Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
 1 5 10 15
 45 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> VARIANTE DE FRL4

 10 <400> 44
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

 <210> 45
 <211> 30
 15 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 <223> VARIANTE 136 DE FRH1
 20
 <400> 45
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30

 <210> 46
 25 <211> 30
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 <220>
 30 <223> VARIANTE 2 DE FRH1

 <400> 46
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
 20 25 30

 35 <210> 47
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

 40 <220>
 <223> VARIANTE 136 DE FRH2

 <400> 47
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10
 45
 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL
 50
 <220>
 <223> VARIANTE 2 DE FRH2

ES 2 566 778 T3

<400> 48
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

5 <210> 49
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10 <220>
 <223> VARIANTE 8 DE FRH2

<400> 49
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

15 <210> 50
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

20 <220>
 <223> VARIANTE 21 DE FRH2

<400> 50
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10

25 <210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

30 <220>
 <223> VARIANTE 136 DE FRH3

35 <400> 51
 Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

40 <210> 52
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

45 <220>
 <223> VARIANTE 1 DE FRH3

<400> 52
 Arg Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

50 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 53
 <211> 32
 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> VARIANTE 43 DE FRH3

5 <400> 53
 Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

10 <210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 15 <223> VARIANTE 103 DE FRH3

<400> 54
 Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

20 <210> 55
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 25 <223> VARIANTE 136 DE FRH4

<400> 55
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30 <210> 56
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Bacteriófago M13mp18

35 <220>
 <221> característica miscelánea
 <223> Secuencia señal del Gen III

40 <400> 56
 Met Glu Trp Ser Gly Val Phe Met Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15

Val His Ser

45 <210> 57
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

50 <220>

ES 2 566 778 T3

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON 136

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 58

<211> 106

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

10

<220>

<223> REGIÓN CONSTANTE DE CADENA LIGERA DEL CLON 136

<400> 58

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

15

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50

55

60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

20

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

ES 2 566 778 T3

<220>

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON 136

5 <400> 59

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60

<211> 330

10 <212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÓN CONSTANTE DE IgG1 HUMANO

15

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

ES 2 566 778 T3

275

280

285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 61
<211> 107
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON CL-2C

<400> 61
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 62
<211> 123
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
20 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON CL-2C

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Trp Tyr

ES 2 566 778 T3

20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 107
5 <212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
10 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON CL-5I

<400> 63
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15 <210> 64
<211> 123
<212> PRT
<213> ARTIFICIAL

<220>
20 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON CL-5I

<400> 64

ES 2 566 778 T3

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

<210> 65
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON CL-5A

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

<210> 66
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

<220>

ES 2 566 778 T3

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON CL-5A

<400> 66

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

5

<210> 67
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

10

<220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON CL-2B

<400> 67

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

20

<210> 68
 <211> 123
 <212> PRT

ES 2 566 778 T3

<213> ARTIFICIAL

<220>

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON CL-2B

5

<400> 68

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Tyr
20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

10

<211> 107

<212> PRT

<213> ARTIFICIAL

<220>

15

<223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA DEL CLON CL-1136-2C

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Ser Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> ARTIFICIAL

5

<220>
 <223> REGIÓN VARIABLE DE CADENA PESADA DEL CLON CL-1136-2C

<400> 70
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10 Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o un fragmento de fijación a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3, y una región variable de la cadena pesada que comprende CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde CDRL1 consiste de la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 5, CDRL2 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 8, CDRL3 consiste en la secuencia aminoacídica **QQSWSWPTT**, CDRH1 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 15, CDRH2 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 25 y CDRH3 consiste en la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 26, en donde el anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo se fija específicamente a IgE.
2. El anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 63, o en donde la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 64.
3. El anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la región variable de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 63 y la región variable de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 64.
4. El anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo comprende además una región constante de la cadena ligera y una región constante de la cadena pesada.
5. El anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la región constante de la cadena ligera tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 58 y la región constante de la cadena pesada tiene la secuencia aminoacídica presentada en la SEQ ID n.º 60.
6. El anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, unido además a una marcación.
7. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o del fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Un kit de diagnóstico que comprende el anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Un método para medir la cantidad de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con el anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y determinar el nivel de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación a antígeno del mismo por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel más alto o más bajo de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación a antígeno del mismo por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene una cantidad más alta o más baja de moléculas de IgE con respecto a las de un sujeto de control.
10. Un método para diagnosticar un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra del sujeto, en donde dicha muestra comprende moléculas de IgE, con el anticuerpo o el fragmento de fijación al antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y determinar el nivel de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación a antígeno del mismo por la muestra con respecto a una muestra de control de un sujeto de control, en donde un nivel más alto o más bajo de retención del anticuerpo o del fragmento de fijación a antígeno del mismo por la muestra del sujeto con respecto a la muestra de control indica que el sujeto tiene un trastorno asociado a una cantidad anómala de IgE.
11. El anticuerpo o fragmento de fijación a antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para ser usado en un método de tratamiento de un trastorno asociado a una cantidad anómalamente alta de IgE en un sujeto.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 o el anticuerpo o fragmento de fijación al antígeno del mismo para ser usado de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el trastorno es asma, rinitis alérgica, eccema, urticaria, dermatitis atópica o una alergia alimentaria.
13. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o el fragmento de fijación a antígeno

del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

14. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 13.

15. La célula de la reivindicación 14, en donde la célula es la de número de depósito de la ATCC PTA-5680.

Figura 1 Vector fágico

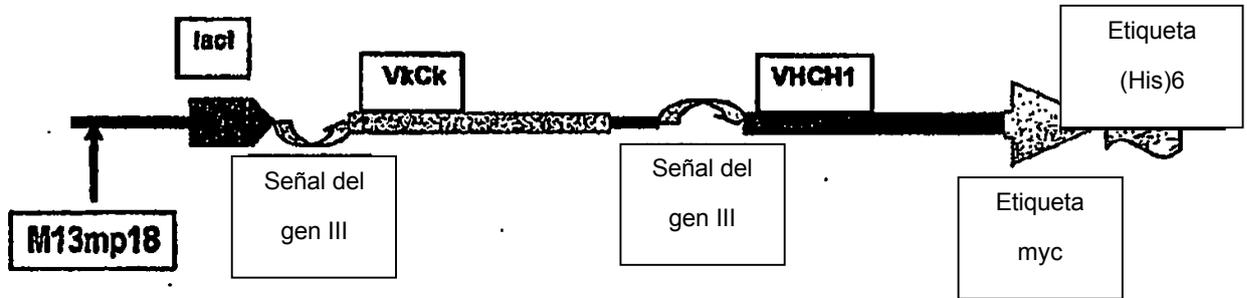


Figura 2

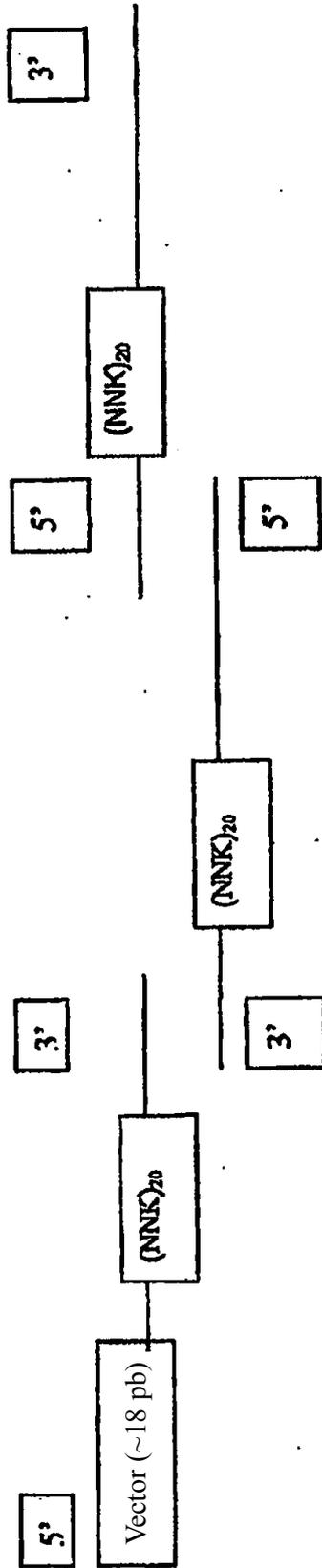


Figura 3 Comparación de TES-C21 y el molde

A. Cadena ligera (Vk) (Subrayado: CDR de Kabat. Negrita/Cursiva: CDR de Clothia) (CADENA LIGERA DE TES-C21: SEQ ID n.º 1 L16/JK4: SEQ ID n.º 2)

Mu L16 VK	D I L L T Q S P A I L S V S P G E R V S F S C R A S Q S I G T N I E H W Y Q Q	10	20	30
	E V M A T L A T L R A S Q S V S S N L A			
TES-C21	R T D G S P R L L I K Y A S E S I S G I P S R R F S G S G T E F T L N I N	40	50	60
L16 VK	K P G Q A Y G A S T R A T			70
TES-C21	B V E S E D I A D Y Y C Q Q S D S W P T T F G G G T K L E I K	80	90	100
L16 VK-JK4	L Q F V Q Q Y N N W P L T			107

B. Cadena pesada (VH)
CADENA PESADA DE TES-C21: SEQ ID n.º 3 DP88/JH4b: SEQ ID n.º 4

Murine DP88 VH	Q V Q L Q Q S G A E L M K P G A S V K I S C K T T G Y T F S M Y W L E W V	1	10	20	30
	V V K S V A B G S Y A I S				
TES-C21	K Q R P G H G L E W V G E I S P Q T F T T N Y N E K F K A K A T F T A D T	40	50	52a	53
DP88 VH	R A Q M G I I P I F G T A N Y A Q K P Q G R V I			60	65
TES-C21	S S N T A Y L Q L S G L T S E D S A V Y F C A R F S H F S G S N Y D Y F D Y	80	82a	b	c
DP88 VH	T S M E S R T Y			90	95
TES-C21	W G Q G T S L T V S B	103	110	113	
DP88-JH4b	L V				

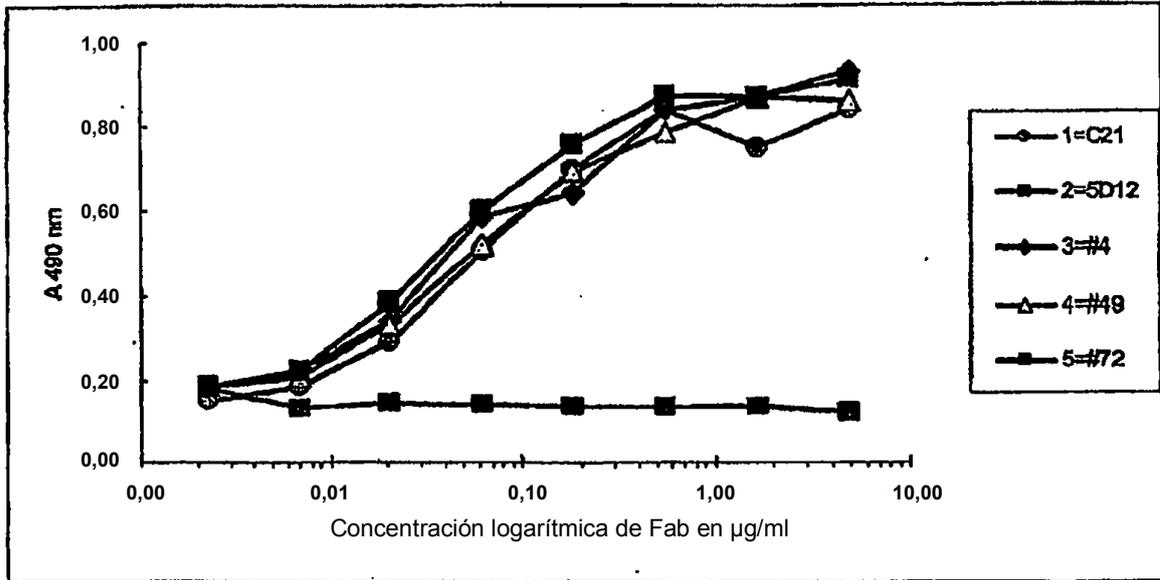
Figura 4 Secuencias flanqueantes de los candidatos de alta afinidad*

Posiciones de VK Ratón Humano	1	3	4	49	60	85	Posiciones de VH Ratón Humano	12	27	43	48	67	69
	D	L	L	K	S	D	M	Y	H	V	A	F	
	E	V	M	Y	A	V	K	G	Q	M	V	I	
1 (ID del clon)	D	L	M	K	S	V	M	Y	H	M	A	F	
2	D	L	L	K	S	V	K	Y	Q	M	V	F	
4	D	L	L	Y	S	V	M	Y	Q	M	V	F	
8	D	L	L	Y	S	V	M	Y	Q	M	V	F	
13	E	V	L	K	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
15	D	L	M	Y	A	V	M	Y	Q	M	V	F	
16	D	L	M	Y	A	V	M	Y	Q	M	V	F	
18	E	L	L	K	S	D	M	Y	Q	M	V	F	
21	D	L	L	Y	A	D	M	Y	H	V	V	F	
23	E	L	L	K	A	D	M	Y	Q	M	V	F	
25	D	L	M	Y	A	V	M	Y	Q	M	V	F	
27	R	L	M	Y	S	D	M	Y	Q	M	V	F	
30	E	V	L	Y	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
31	E	V	L	Y	A	D	K	Y	H	V	V	F	
33	E	V	L	Y	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
35	E	V	M	Y	A	D	K	Y	H	M	V	F	
38	E	V	M	K	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
43	E	V	L	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
44	E	V	L	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
45	E	V	L	K	A	D	M	Y	Q	M	V	F	
46	E	V	L	K	A	D	M	Y	H	M	V	F	
48	E	V	M	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
49	E	V	M	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
50	D	L	L	Y	A	D	M	Y	Q	M	V	F	
52	E	L	L	Y	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
53	D	L	L	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
56	D	L	M	Y	S	V	M	Y	H	M	V	F	
58	D	L	M	K	S	V	M	Y	H	M	V	F	
61	D	V	M	K	S	V	M	Y	H	M	V	F	
63	D	V	L	K	S	V	K	Y	Q	M	V	F	
64	E	V	L	K	S	D	K	Y	Q	M	V	F	
68	D	V	L	Y	S	D	M	Y	Q	M	V	F	
70	D	V	L	Y	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
72	D	V	L	Y	A	D	K	Y	H	M	V	F	
75	E	L	L	K	S	V	K	Y	Q	M	V	F	
78	D	L	M	Y	S	V	M	Y	Q	M	V	F	
78	D	V	M	Y	S	D	M	Y	Q	M	V	F	
81	E	V	L	K	S	D	M	Y	Q	M	V	F	
83	E	V	L	K	A	D	M	Y	H	M	V	F	
86	E	L	M	K	A	D	M	Y	Q	M	V	F	
89	E	L	M	Y	A	D	M	Y	H	M	V	F	
90	D	L	M	Y	A	D	K	Y	Q	M	V	F	
93	E	L	M	K	A	D	M	Y	H	M	V	F	
103	D	L	L	Y	A	D	M	Y	Q	M	V	F	
109	D	L	L	K	S	V	R	Y	H	M	V	F	
114	D	L	L	Y	A	D	R	Y	Q	M	V	F	
124	E	V	L	Y	S	D	K	Y	Q	M	V	F	
128	D	V	L	Y	A	D	R	Y	Q	M	V	F	
135	D	V	L	K	S	V	R	Y	Q	M	V	F	
136	E	V	L	Y	A	D	R	Y	H	M	V	F	
152	E	V	L	Y	S	V	R	Y	H	M	V	F	
153	D	L	L	Y	S	D	K	Y	Q	M	V	F	
157	D	L	M	Y	S	D	K	Y	Q	M	V	F	
1136-2C	E	V	M	Y	S	D	K	Y	Q	M	V	F	

*P = secuencia madre; T = secuencia del molde de humano; los aminoácidos recogidos en **negrita** son restos murinos

Figura 5 CURVAS DE TITULACIÓN POR ELISA

A



B

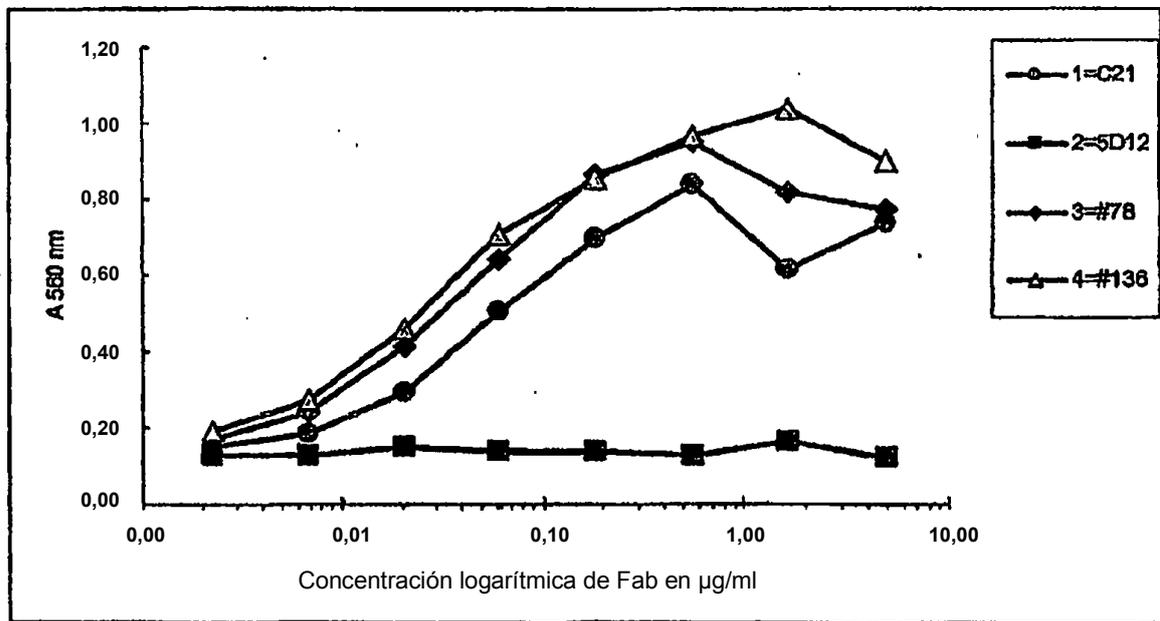


Figura 6 Ensayo de inhibición

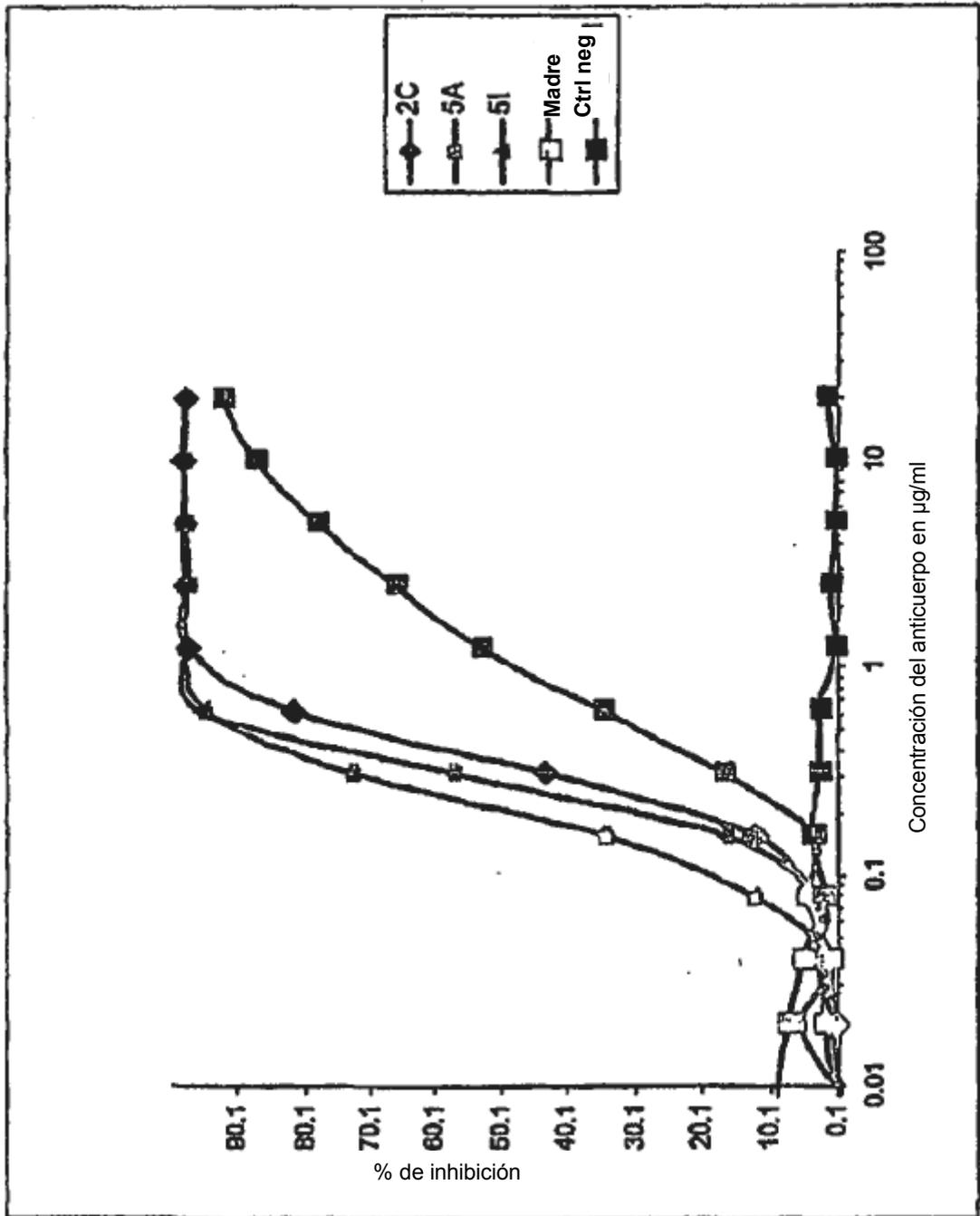


Figura 7: Lista de candidatos de alta afinidad de la genoteca

Clon	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3	CDR-H1	CDR-H2	CDR-H3
136	RASRSIGTNIH	YASESIS	QQSWSWPTT	MYWLE	EISPGTFTTNYNEKFKA	FSHFSGSNYDYFDY
L3-9	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	wt	wt
CL-2G	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	wt	wt
R5-E	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	wt	wt
R87-E	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-2I	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt
R2-C	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-2C	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-2H	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-2B	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-3A	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EISPETFTTNYNEKFKA	wt
R47-E	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EISPDFTTNYNEKFKA	wt
CL-3G	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EISPETFTTNYNEKFKA	wt
R3-A	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EISPDFTTNYNEKFKA	wt
CL-3C	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EISPETFTTNYNEKFKA	wt
CL-3E	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EISPDFTTNYNEKFKA	wt
R5-K	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EISPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-4B	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EISPGTFTTNYNEKFKA	wt
R5-D	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EISPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-5G	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-5I	wt	wt	QQSWSWPTT	wt	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-5A	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
CL-5H	wt	wt	QQSWSWPTT	WYWLE	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt
R5-H	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EIEPGTFTTNYNEKFKA	wt
R5-N	wt	wt	QQSWSWPTT	YYWLE	EIDPGTFTTNYNEKFKA	wt

Los cambios de la secuencia de aminoácidos original están recogidos en **NEGRITA**.

wt: tipo silvestre

Figura 8A

Alineamiento de VK

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	SEQ ID		35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	SEQ ID			
136	E	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	C	30	24-34	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	38	50-56	
1	D	I	L	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	31	CDR-L1	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y	39	CDR-L2
2	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	32		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
4	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	33		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
13	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	34		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
15	D	I	L	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	35		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
18	E	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	36		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
23	E	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	37		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
25	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	38		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
27	E	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	39		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
30	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	40		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
31	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	41		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
33	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	42		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
35	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	43		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
38	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	44		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
46	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	45		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
48	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	46		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
50	D	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	47		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
52	E	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	48		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
63	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	49		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
56	D	I	L	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	50		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
58	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	51		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
63	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	52		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
64	E	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	53		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
70	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	54		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
72	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	55		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
75	E	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	56		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
78	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	57		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
81	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	58		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
86	E	I	L	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	59		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
89	E	I	L	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	60		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
90	D	I	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	61		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
109	D	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	62		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
114	D	I	L	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	63		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		
124	E	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	64		W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	R	L	L	L	L	Y		

Figura 10A Secuencia polipeptídica del Acm 136

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQOKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SDSWPITFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 57)

REGIÓN CONSTANTE C_k

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC** (SEQ ID n.º 58)

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_H

**QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS MYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
ISPGETFTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFGSNGYDYF DYWGQGTLLVTVSS** (SEQ ID n.º 59)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKHTTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Figura 10B Secuencia polipeptídica del Acm CL-2C

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKQ GOAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLOS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 61)

REGIÓN CONSTANTE C_k

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC** (SEQ ID n.º 58)

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_H (2C)

**QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IDPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGLVT VSS** (SEQ ID n.º 62)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
KSCDKHTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREBQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LKSDGTSFELY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Figura 10C Secuencia polipeptídica del Acm CL-5I

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 63)

REGIÓN CONSTANTE C_k (SEQ ID n.º 58)

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC**

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_H (5I)

**QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS MYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IDPGTFETNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGLVTVSS** (SEQ ID n.º 64)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFNCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Figura 10D Secuencia polipeptídica del Acm CL-5A

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 65)

REGIÓN CONSTANTE C_k (SEQ ID n.º 58)

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYSLSSST LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC**

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS ((SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE VH (5A)

**QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IEPGTETTNV NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGTLVV VSS** (SEQ ID n.º 66)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVDVVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFLY SKLTVDKSRW
QQGNVDFCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Figura 10E Secuencia polipeptídica del Acm CL-2B

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQOKP GOAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDPAVYYCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 67)

REGIÓN CONSTANTE C_k (SEQ ID n.º 58)

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC**

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE VH (2B)

**QVQLVQSGAE VMKPGSSVKV SCKASGYTFS YWLEWVRQA PGHGLEWMGE
IDPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGTLVV VSS** (SEQ ID n.º 68)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP
KSCDKHTTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSPFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**

Figura 10F Secuencia polipeptídica del Acm CL-1136-2C

CADENA LIGERA

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_k

**EIVMTQSPAT LSVSPGERAT LSCRASQSIG TNIHWYQQKP GQAPRLLIYY
ASESISGIPA RFSGSGSGTE FTLTISSLQS EDFAVYYCQQ SWSWPTTFGG
GTKVEIK** (SEQ ID n.º 69)

REGIÓN CONSTANTE C_k (SEQ ID n.º 58)

**TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
SQESVTEQDS KDSTYLSLST LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS
FNRGEC**

CADENA PESADA (IgG1)

PÉPTIDO SEÑAL

MEWSGVFMFLLSVTAGVHS (SEQ ID n.º 56)

REGIÓN VARIABLE V_H

**QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS WYWLEWVRQA PGQGLEWMGE
ISPGTFTTNY NEKFKARVTF TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARFS
HFSGSNYDYF DYWGQGLVTVSS** (SEQ ID n.º 70)

REGIÓN CONSTANTE CH1-3(IgG1) (SEQ ID n.º 60)

**ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NFKVDKKVEP
KSCDKHTHCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSD
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGTSFLLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSQSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK**