

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 154**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.07.2013 PCT/EP2013/064090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.07.2013 E 13737564 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2869837**

54 Título: **Anticuerpos antiteofilina y métodos de uso**

30 Prioridad:

04.07.2012 EP 12174958

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

07.02.2017

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**BRINKMANN, ULRICH;
GEORGES, GUY y
HOFFMANN, EIKE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 600 154 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 antiteofilina y métodos de uso

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos antiteofilina y métodos de uso de los mismos.

Antecedentes

10 Los anticuerpos de unión a hapteno pueden aplicarse como módulos de captura para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico. Por ejemplo, las entidades unidas a hapteno tales como fluoróforos, reactivos quelantes, péptidos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos, nanopartículas y muchos otros agentes pueden reaccionar con anticuerpos de unión a hapteno y derivados de anticuerpo. Esto permite la detección eficaz de dichas "cargas útiles", así como
15 captura, acumulación en localizaciones deseadas, reticulación y otros efectos mediados por anticuerpo. Ya que las características y la composición de los haptenos pueden influir en la composición y el "comportamiento" de entidades unidas a hapteno (incluyendo tamaño, solubilidad, actividad, propiedades biofísicas, PK, efectos biológicos y más), se desea en gran medida desarrollar una diversidad de entidades de unión a hapteno diferentes. Por lo tanto, es posible emparejar un hapteno seleccionado con una carga útil para generar conjugados de hapteno optimizados.
20 Posteriormente, pueden combinarse entidades de unión a hapteno óptimas con dichos conjugados para generar complejos de anticuerpo óptimo-hapteno-carga útil. Se desea adicionalmente tener entidades de unión a hapteno tales como derivados de anticuerpo que están humanizados. Esto permite aplicaciones con riesgo significativamente reducido de interferencia tales como inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas.

25 En el documento WO 2010/119704 se presentan anticuerpos que se unen específicamente con oligómeros beta y uso de los mismos. Se presenta un ensayo competitivo nuevo para teofilina y reactivo para uso en el mismo en el documento US 4.855.226. En el documento WO 2010/045388 se presenta el uso de proteínas de unión MMP-9 y MMP-12 para el tratamiento y la prevención de esclerosis sistémica. Se presentan ensayos electroquimioluminiscentes basados en partículas en el documento US 6.881.536.

30 Sumario

La invención proporciona anticuerpos antiteofilina y métodos de uso de los mismos.

35 Un aspecto como se indica en el presente documento es un anticuerpo antiteofilina humanizado, en el que el anticuerpo comprende

40 (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07,

45 en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y comprende en la posición 71 del dominio variable de cadena pesada numerado de acuerdo con Kabat el resto de aminoácido arginina y comprende en la posición 46 del dominio variable de cadena ligera numerado de acuerdo con Kabat el resto de aminoácido leucina.

50 En una realización el anticuerpo comprende (a) una secuencia de VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 04; (b) una secuencia de VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; o (c) una secuencia de VH como en (a) y una secuencia de VL como en (b), en la que el resto de aminoácido en la posición 71 del dominio variable de cadena pesada numerado de acuerdo con Kabat es arginina y el resto de aminoácido en la posición 46 del dominio variable de cadena ligera numerado de acuerdo con Kabat es leucina.

55 En una realización el anticuerpo comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 04.

En una realización el anticuerpo comprende una secuencia de VL de SEQ ID NO: 08.

60 Un aspecto como se indica en el presente documento es un anticuerpo que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 04 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 08.

En una realización el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 de longitud completa o un anticuerpo IgG4 de longitud completa.

65 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En una realización el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une con teofilina.

Un aspecto como se indica en el presente documento es una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo como se indica en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto como se indica en el presente documento es el anticuerpo como se indica en el presente documento para su uso como un medicamento.

Un aspecto como se indica en el presente documento es el uso del anticuerpo como se indica en el presente documento en la fabricación de un medicamento.

Descripción de las Figuras

Figura 1 Expresión de anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen con teofilina: SDS PAGE reductor muestra composición y homogeneidad de anticuerpos quiméricos (carril medio) y humanizados (carril derecho) después de la purificación con proteína A y SEC. El marcador de peso molecular se aplicó en el carril izquierdo. Las cadenas H (banda superior a 50k) y cadenas L (banda inferior a 25k) de anticuerpos son detectables como bandas únicas sin presencia de cantidades visibles de contaminaciones de proteína adicionales.

Figura 2 ELISA de teofilina que demuestra unión específica y eficaz del anticuerpo con teofilina inmovilizada.

Figura 3 Perfiles de unión de los anticuerpos de unión a teofilina en experimentos de SPR.

Figura 4 a) Composición, estructura y peso molecular de teofilina-Cys-Cys; b) la cromatografía de exclusión por tamaño demuestra pureza y homogeneidad de las variantes de anticuerpos de unión a teofilina purificadas; el pico N.º 2 muestra el producto purificado, la falta de pico número N.º 1 indica que dichas preparaciones están libres de agregados; c) formación de complejos covalentes entre anticuerpos de unión a teofilina y teofilina-Cys-Cy5 como se demuestra por SDS PAGE no reductor (carriles izquierdos) y reductor (carriles derechos); Cy5 aparece acoplado a la cadena H en condiciones no reductoras solamente en muestras que contenían teofilina-Cys-Cy5 y anticuerpo cismutado, estos conjugados covalentes se disgregan tras la reducción (carriles derechos); carriles 1: Marcador de peso molecular; 2-4 no reductor - 2: anticuerpo anti-teofilina (sin cismutación) + teofilina-Cys-Cy5 (complejo); 3: anticuerpo anti-teofilina anticuerpo-cys_55 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 4: anticuerpo anti-teofilina -cys_54 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 5-7 reductor - 5: anticuerpo anti-teofilina (sin cismutación) + teofilina-Cys-Cy5 (complejo); 6: anticuerpo anti-teofilina -cys_55 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado); 7: anticuerpo anti-teofilina -cys_54 + teofilina-Cys-Cy5 (conjugado).

Figura 5 La afinidad del anticuerpo de unión a teofilina se evaluó por experimentos de resonancia de plasmón superficial (BIAcore). Se capturaron fragmentos Fab del anticuerpo en la microplaca mediante anti-HuFab, seguido de exposición a carga útil que contenía monoteofilina (Teo-péptido). Se formaron complejos definidos 1:1 (Fab:teofilina-carga útil). Además de la unión rápida (velocidad de asociación), no se observó ninguna velocidad de disociación detectable, es decir, ninguna liberación relevante del antígeno unido.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

I. Definiciones

Un "marco conservado humano aceptor" para los fines del presente documento es un marco conservado que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco conservado de dominio variable de cadena ligera (VL) o un marco conservado de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano, como se define posteriormente. Un marco conservado humano aceptor "derivado de" un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos. En algunas realizaciones, el marco conservado humano aceptor de VL es idéntico en secuencia a la secuencia de marco conservado de inmunoglobulina humana VL o secuencia de marco conservado consenso humano.

"Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). Si no se indica de otro modo, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su compañera Y puede representarse en general por la constante de disociación (Kd). La afinidad puede medirse por métodos habituales conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en el presente

documento. Se describen realizaciones ilustrativas y ejemplares específicas para medir la afinidad de unión a continuación.

5 Un anticuerpo "de afinidad madurada" se refiere a un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más regiones hipervariables (HVR), en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones, dando como resultado dichas alteraciones una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno.

10 Las expresiones "anticuerpo anti-teofilina" y "un anticuerpo que se une a teofilina" se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse con teofilina con suficiente afinidad de modo que el anticuerpo sea útil como un agente de diagnóstico y/o terapéutico en la dirección a teofilina. En una realización, el alcance de la unión de un anticuerpo anti-teofilina con una proteína distinta a teofilina, no relacionada, es menor de aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo con teofilina como se mide, por ejemplo, por un radioinmunoensayo (RIA). En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se une con teofilina tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8} M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M).

20 El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multispecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad de unión a antígeno deseada.

25 Un "fragmento de anticuerpo" se refiere a una molécula distinta de un anticuerpo intacto que comprende una parte de un anticuerpo intacto que se une con el antígeno con el que se une el anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multispecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

30 Un "anticuerpo que se une con el mismo epítipo" como un anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia con su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo con su antígeno en un ensayo de competición en 50 % o más. Se proporciona en el presente documento un ensayo de competición ejemplar.

35 El término anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo en el que una parte de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie en particular, mientras que el resto de la cadena pesada y/o ligera deriva de una fuente o especie diferente.

40 La "clase" de un anticuerpo se refiere al tipo de dominio constante o región constante poseído por su cadena pesada. Hay cuatro clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulina se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente.

45 La expresión "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o provoca muerte o destrucción celular. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu); agentes o fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes); agentes inhibidores del crecimiento; enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas; antibióticos; toxinas tales como moléculas pequeñas toxinas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas; y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados posteriormente.

50 "Funciones efectoras" se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc de un anticuerpo, que varían con la clase de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión de C1q y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B); y activación de linfocitos B.

60 Una "cantidad eficaz" de un agente, por ejemplo, una formulación farmacéutica, se refiere a una cantidad eficaz, a dosis durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

65 La expresión "región Fc" en el presente documento se usa para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. En una realización, una región Fc de cadena de IgG humana se extiende de Cys226, o de Pro230, al extremo carboxilo terminal de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina C terminal (Lys447) de la región de Fc puede estar presente o no. A no ser que se especifique de otro modo en el presente

documento, la numeración de restos de aminoácidos en la región Fc o región constante es de acuerdo con el sistema de numeración de EU, también denominado el índice EU, como se describe en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242.

"Marco conservado" o "FR" se refiere a restos de dominio variable distintos de los restos de región hipervariable (HVR). La FR de un dominio variable generalmente consiste en cuatro dominios FR: FR1, FR2, FR3 y FR4. En consecuencia, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo que tiene una estructura sustancialmente similar a una estructura de anticuerpo nativa o que tiene cadenas pesadas que contienen una región Fc como se define en el presente documento.

Las expresiones "célula hospedadora", "línea celular hospedadora" y "cultivo de células hospedadoras" se usan indistintamente y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, incluyendo la descendencia de dichas células. Las células hospedadoras incluyen "transformantes" y "células transformadas", que incluyen la célula transformada primaria y descendencia derivada de la misma independientemente del número de pases. La descendencia puede no ser completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula parental, pero puede contener mutaciones. La descendencia mutante que tiene la misma función o actividad biológica como se explora o se selecciona en la célula transformada originalmente se incluye en el presente documento.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano o una célula humana o derivado de una fuente no humana que utiliza repertorios de anticuerpos humanos u otras secuencias codificantes de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígenos no humanos.

Un "marco conservado consenso humano" es un marco conservado que representa los restos de aminoácidos que aparecen más habitualmente en una selección de secuencias de marco conservado de VL o VH de inmunoglobulina humana. En general, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias de dominio variable. En general, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Bethesda MD (1991), Publicación NIH 91-3242, Vol. 1-3. En una realización, para VL, el subgrupo es subgrupo kappa I como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente. En una realización, para VH, el subgrupo es subgrupo III como en Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo quimérico que comprende restos de aminoácidos de HVR no humanas y restos de aminoácidos de FR humanas. En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las HVR (por ejemplo, CDR) corresponden a las de un anticuerpo no humano, y todas o sustancialmente todas las FR corresponden a las de un anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender al menos una parte de una región constante de anticuerpo derivada de un anticuerpo humano. Una "forma humanizada" de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo no humano se refiere a un anticuerpo que ha experimentado humanización.

La expresión "región hipervariable" o "HVR", como se usa en el presente documento, se refiere a cada una de las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles estructuralmente definidos ("bucles hipervariables"). En general, los anticuerpos de cuatro cadenas nativos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3), y tres en el VL (L1, L2, L3). Las HVR generalmente comprenden restos de aminoácidos de los bucles hipervariables y/o de las "regiones determinantes de complementariedad" (CDR), siendo estas últimas de mayor variabilidad de secuencia y/o implicadas en el reconocimiento de antígenos. Aparecen bucles hipervariables ejemplares en los restos de aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3). (Chothia, C. y Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917) CDR ejemplares (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3) aparecen en los restos de aminoácidos 24-34 de L1, 50-56 de L2, 89-97 de L3, 31-35B de H1, 50-65 de H2 y 95-102 de H3. (Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), publicación NIH 91-3242.) Con la excepción de CDR1 en VH, las CDR comprenden generalmente los restos de aminoácidos que forman los bucles hipervariables. Las CDR también comprenden "restos determinantes de especificidad" o "SDR" que son restos que entran en contacto con el antígeno. Los SDR están contenidos dentro de las regiones de las CDR denominadas CDR abreviadas o a-CDR. Aparecen a-CDR ejemplares (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 y a-CDR-H3) en los restos de aminoácidos 31-34 de L1, 50-55 de L2, 89-96 de L3, 31-35B de H1, 50-58 de H2 y 95-102 de H3. (Véase Almagro, J.C. y Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633). A no ser que se indique de otro modo, los restos de HVR y otros restos en el dominio variable (por ejemplo, restos de FR) se numeran en el presente documento de acuerdo con Kabat *et al.*, mencionado anteriormente.

Un "inmunoconjugado" es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, incluyendo, pero sin limitación, un agente citotóxico.

5 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

10 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha separado de un componente de su ambiente natural. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica a más de 95 % o 99 % de pureza como se determina, por ejemplo, mediante electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE, isoelectroenfoque (IEF), electroforesis capilar) o cromatografía (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una revisión de métodos para evaluación de la pureza de anticuerpos, véase, por ejemplo, Flatman, S. *et al.*, J. Chrom. B 848 (2007) 79-87.

15 Un ácido nucleico "aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un componente de su ambiente natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que contienen habitualmente la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una localización cromosómica que es diferente de su localización cromosómica natural.

20 "Ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo antiteofilina" se refiere a una o más moléculas de ácido nucleico que codifican cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo (o fragmentos de las mismas), incluyendo dicha o dichas moléculas de ácido nucleico en un único vector o en vectores separados, y dicha o dichas moléculas de ácido nucleico presentes en una o más localizaciones en una célula hospedadora.

25 La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen con el mismo epítipo, excepto por posibles anticuerpos variantes, por ejemplo, que contienen mutaciones de origen natural o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, estando dichas variantes generalmente presentes en cantidades menores. A diferencia de preparaciones de anticuerpo policlonales, que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción de un anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por una diversidad de técnicas, incluyendo, pero sin limitación, el método de hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de presentación en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen todos o partes de los loci de inmunoglobulina humana, describiéndose en el presente documento dichos métodos y otros métodos ejemplares para preparar anticuerpos monoclonales.

40 Un "anticuerpo desnudo" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo desnudo puede estar presente en una formulación farmacéutica.

45 "Anticuerpos nativos" se refiere a moléculas de inmunoglobulina de origen natural con diversas estructuras. Por ejemplo, son anticuerpos IgG nativos glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 Dalton, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y de dos cadenas pesadas idénticas que tienen enlaces de disulfuro. Del extremo N a C terminal, cada cadena pesada tiene una región variable (VH), también denominada un dominio pesado variable o un dominio variable de cadena pesada, seguido de tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3). De forma similar, del extremo N a C terminal, cada cadena ligera tiene una región variable (VL), también denominada un dominio ligero variable o un dominio variable de cadena ligera, seguido de un dominio ligero constante (CL). La cadena ligera de un anticuerpo puede asignarse a uno de dos tipos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en la secuencia de aminoácidos de su dominio constante.

55 El término "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones incluidas habitualmente en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

60 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin tener en cuenta en ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. Puede conseguirse alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir alineamiento máximo

sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines del presente documento, sin embargo, se generan valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 tuvo autoría de Genentech, Inc., y el código fuente se ha presentado con la documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, en la que está registrado con el número de registro de derechos de autor de Estados Unidos N.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX incluyendo UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias se establecen por el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 por la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A no ser que se indique específicamente de otro modo, todos los valores de porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en forma tal que permite que la actividad biológica de un principio activo contenido en la misma sea eficaz, y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizador o conservante.

El término "teofilina", abreviado "TEO", indica 1,3-dimetil-7H-purina-2,6-diona. La teofilina también se conoce como dimetilxantina.

Como se usa en el presente documento, el "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "tratando") se refiere a intervención clínica en un intento de alterar el ciclo natural del individuo que se trata, y puede realizarse bien para profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables de tratamiento incluyen, pero sin limitación, prevención de la aparición o reaparición de enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de la metástasis, reducción de la tasa de progresión de enfermedad, alivio o paliación de la patología y remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o para ralentizar la progresión de una enfermedad.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere al dominio de una cadena pesada o ligera de anticuerpo que está implicado en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios variables de la cadena pesada y cadena ligera (VH y VL, respectivamente) de un anticuerpo nativo generalmente tienen estructuras similares, comprendiendo cada dominio cuatro regiones marco conservadas (FR) y tres regiones hipervariables (HVR). (Véase, por ejemplo, Kindt, T.J. *et al.* Kuby Immunology, sexta ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), página 91) Un único dominio VH o VL puede ser suficiente para conferir especificidad de unión a antígeno. Además, los anticuerpos que se unen con un antígeno particular pueden aislarse usando un dominio VH o VL de un anticuerpo que se une con el antígeno para explorar una biblioteca de dominios VL o VH complementarios, respectivamente. Véase, por ejemplo, Portolano, S. *et al.*, J. Immunol. 150 (1993) 880-887; Clackson, T. *et al.*, Nature 352 (1991) 624-628).

El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de propagar otro ácido nucleico al que se une. El término incluye el vector como una estructura de ácido nucleico autorreplicativa, así como el vector incorporado en el genoma de una célula hospedadora en la que se ha introducido. Ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos operativamente. Estos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión".

El término "hapteno" indica una molécula pequeña que puede inducir una respuesta inmunitaria solamente cuando se une a un vehículo grande tal como una proteína. Los haptenos ejemplares son anilina, ácido o-, m- y p-aminobenzoico, quinona, hidralacina, halotano, fluoresceína, biotina, digoxigenina, teofilina y dinitrofenol. En una

realización, el hapteno es biotina o digoxigenina o teofilina o carborano.

La expresión “un hapteno está conjugado con” o “compuesto haptencilado” indica un hapteno que está unido covalentemente con un resto adicional tal como un polipéptido o un marcador. Los derivados de hapteno activados se usan con frecuencia como materiales de partida para la formación de dichos conjugados. En una realización el hapteno es digoxigenina y está conjugado (en una realización mediante su grupo 3-hidroxi) con el resto mediante un enlazador. En una realización el enlazador comprende a) uno o más (en una realización 3 a 6) grupos de metileno-carboxi-metilo (-CH₂-C(O)-), y/o b) de 1 a 10 (en una realización de 1 a 5) restos de aminoácidos (en una realización seleccionado de glicinia, serina, glutamato, β-alanina, γ-ácido aminobutírico, ε-ácido aminocaproico o lisina) y/o c) uno o más (en una realización 1 o 2) compuestos que tienen la fórmula estructural NH₂-[(CH₂)_nO]_xCH₂-CH₂-COOH en la que n es 2 o 3 y x es 1 a 10, en una realización 1 a 7. El último elemento da como resultado (al menos parcialmente) un enlazador (parte) de la fórmula -NH-[(CH₂)_nO]_xCH₂-CH₂-C(O)-. Un ejemplo de dicho compuesto es, por ejemplo, ácido 12-amino-4,7,10-trioxadodecanoico (da como resultado un enlazador de TEG (tietrilenglicol)). En una realización el enlazador comprende además un grupo maleimido. El enlazador tiene un efecto estabilizante y solubilizante ya que contiene cargas y/o puede formar enlaces de hidrógeno. Además, puede facilitar de forma estérica la unión del anticuerpo antihapteno con el polipéptido conjugado con hapteno. En una realización el enlazador está localizado en una cadena lateral de un aminoácido del polipéptido (por ejemplo, conjugado con una cadena lateral de lisina o cisteína mediante un grupo amino o tiol). En una realización el enlazador está localizado en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal del polipéptido. La posición del enlazador en el polipéptido se elige típicamente en una región en la que la actividad biológica del polipéptido no se ve afectada. Por lo tanto, la posición de unión del enlazador depende de la naturaleza del polipéptido y los elementos de estructura relevantes que son responsables de la actividad biológica. La actividad biológica del polipéptido con el que puede unirse el hapteno puede ensayarse en un ensayo *in vitro*.

La expresión “formación de complejo covalente” indica que después de la formación de un complejo no covalente, por ejemplo, entre un anticuerpo anti-teofilina y teofilina, se forma un enlace covalente entre los dos compañeros en el complejo. La formación del enlace covalente tiene lugar sin la necesidad de añadir reactivos adicionales.

II. Composiciones y métodos

En un aspecto, la invención se basa en anticuerpos que se unen con teofilina. Estos anticuerpos se proporcionan en el presente documento. Los anticuerpos de la invención son útiles, por ejemplo, como anticuerpos monoespecíficos para la unión de compuestos teofilinilados y como anticuerpos multiespecíficos para el diagnóstico o el tratamiento de todo tipo de enfermedades usando la especificidad de unión por el compuesto teofilinilado como característica de carga útil universal del anticuerpo.

A. Anticuerpos anti-teofilina ejemplares

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen con teofilina. En ciertas realizaciones los anticuerpos anti-teofilina son anticuerpos anti-teofilina humanizados. En ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-teofilina como se indica en el presente documento se unen con compuestos teofilinilados sin interferir con la actividad biológica del compuesto que se conjuga con teofilina y se unen específicamente con el anticuerpo mediante el resto de teofilina. Por lo tanto estos anticuerpos pueden usarse para mejorar las propiedades farmacocinéticas de compuestos conjugados con teofilina (compuesto teofilinilado) si el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico. Además estos anticuerpos pueden usarse para el suministro dirigido de un compuesto teofilinilado si el anticuerpo es un anticuerpo bi o multiespecífico ya que se dirige una especificidad de unión contra teofilina y puede usarse como especificidad de carga útil universal mientras que una segunda especificidad de unión se une específicamente por ejemplo con una molécula de superficie celular y proporciona la característica/componente de dirección del anticuerpo bi o multiespecífico.

En el presente documento se indica un anticuerpo anti-teofilina que comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07.

En el presente documento se presenta un anticuerpo anti-teofilina que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR VH seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03. El anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03. El anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07. El anticuerpo que comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02. El anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01; (b)

HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03.

En el presente documento se presenta un anticuerpo anti-teofilina que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de HVR VL seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07. El anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07.

En el presente documento se presenta un anticuerpo anti-teofilina que comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres VL HVR seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-teofilina que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07.

En una realización, el anticuerpo anti-teofilina es humanizado.

Se presenta en el presente documento un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Se presenta en el presente documento un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende al menos una, al menos dos, o las tres VH HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En una realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En otra realización, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En una realización adicional, el anticuerpo comprende HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, y HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En una realización adicional, el anticuerpo comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

Se presenta en el presente documento un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende al menos una, al menos dos, o las tres VL HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En una realización, el anticuerpo comprende (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Se presenta en el presente documento un anticuerpo que comprende (a) un dominio VH que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias de VH HVR seleccionadas de (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (iii) HVR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; y (b) un dominio VL que comprende al menos una, al menos dos, o las tres secuencias HVR VL seleccionadas de (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14, y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

Se presenta en el presente documento un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia

de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 15.

En otro aspecto, al invención proporciona un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01; (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02; (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03; (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (f) HVR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07, en el que el resto de aminoácido en la posición 60 en la HVR-H2 es A y el resto de aminoácido de la posición 61 en la HVR-H2 es Q.

El anticuerpo anti-teofilina humanizado comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano. El anticuerpo anti-teofilina humanizado comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y comprende, además

- R en la posición 71.

La posición 71 de Kabat corresponde al número de resto 72 de SEQ ID NO: 04, 12 y 20.

Este cambio (retromutación) se introdujo para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo anti-teofilina humanizado.

En otro aspecto, un anticuerpo anti-teofilina comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 04. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-teofilina que comprende esa secuencia conserva la capacidad para unirse con teofilina. En ciertas realizaciones, un total de 1 a 10 aminoácidos se han sustituido, insertado y/o suprimido en SEQ ID NO: 04.

En ciertas realizaciones, se producen sustituciones, inserciones o supresiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-teofilina comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 04, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-teofilina, en el que el anticuerpo que comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-teofilina que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse con teofilina. En ciertas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 08. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o supresiones aparecen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-teofilina comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO: 08, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, la VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07.

En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-teofilina, en el que el anticuerpo comprende un VH, como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO: 04 y SEQ ID NO: 08, respectivamente, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esas secuencias.

El anticuerpo anti-teofilina humanizado comprende HVR como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y comprende además un marco conservado humano aceptor, por ejemplo, un marco conservado de inmunoglobulina humana o un marco conservado consenso humano. En una realización, un anticuerpo anti-teofilina humanizado comprende un VL que comprende HVR-L como en cualquiera de las realizaciones anteriores, y comprende, además

- L en la posición 46.

La posición 46 de Kabat corresponde al número de resto 51 de SEQ ID NO: 08, 16 y 24.

Este cambio (retromutación) se introdujo para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo anti-teofilina humanizado.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-teofilina humanizado que comprende una secuencia de dominio variable de cadena pesada (VH) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, una secuencia de VH que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-teofilina que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse con teofilina. En ciertas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o suprimido un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 12. En ciertas realizaciones, aparecen sustituciones, inserciones o supresiones en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-teofilina comprende la secuencia de VH en SEQ ID NO: 12, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VH comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de: (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 09, (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-teofilina humanizado, en el que el anticuerpo comprende un dominio variable de cadena ligera (VL) que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, una secuencia de VL que tiene al menos 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad contiene sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservativas), inserciones o supresiones en relación con la secuencia de referencia, pero un anticuerpo anti-teofilina que comprende esa secuencia conserva la capacidad de unirse con teofilina. En ciertas realizaciones, se han sustituido, insertado y/o sustituido un total de 1 a 10 aminoácidos en SEQ ID NO: 16. En ciertas realizaciones, las sustituciones, inserciones o supresiones aparecen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). Opcionalmente, el anticuerpo anti-teofilina comprende la secuencia de VL en SEQ ID NO: 16, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esa secuencia. En una realización particular, el VL comprende una, dos o tres HVR seleccionadas de (a) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13; (b) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y (c) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

En el presente documento se proporciona un anticuerpo anti-teofilina humanizado, en el que el anticuerpo comprende un VH como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y un VL como en cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente. En una realización, el anticuerpo comprende las secuencias de VH y VL en SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 16, respectivamente, incluyendo modificaciones posttraduccionales de esas secuencias.

En un aspecto adicional de la invención, un anticuerpo antiteofilina de acuerdo con cualquiera de las de las realizaciones anteriores es un anticuerpo monoclonal, incluyendo un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En una realización, un anticuerpo anti-teofilina es un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un fragmento Fv, Fab, Fab', scFv, diacuerpo o F(ab')₂. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4 intacto u otra clase o isotipo de anticuerpo como se define en el presente documento.

En un aspecto adicional, un anticuerpo anti-teofilina de acuerdo con cualquiera de las realizaciones anteriores puede incorporar cualquiera de las características, individualmente o en combinación, descritas en las secciones 1-5 posteriormente:

1. Afinidad de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 0,001$ nM (por ejemplo, 10^{-12} M o menos, por ejemplo, de 10^{-12} M a 10^{-13} M).

En una realización, Kd se mide por un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de FAB por antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen, Y. *et al.*, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, se recubren placas multipocillo MICROTITER® (Thermo Scientific) durante una noche con 5 mg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y se bloquea posteriormente con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante 2 a 5 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no absorbente (Nunc n.º 269620), se mezcla [¹²⁵I]-antígeno 100 pM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta, L.G. *et al.*, Cancer Res. 57 (1997) 4593-4599). El Fab de interés se incubaba después durante una noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después se retira la solución y la placa se lava 8 veces con polisorbato 20 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de agente de centelleo (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se recuentan

en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporciona menos de o igual a 20 % de unión máxima para uso en ensayos de unión competitiva.

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

2. Fragmentos de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv y scFv, y otros fragmentos descritos posteriormente. Para una revisión de ciertos fragmentos de anticuerpo, véase Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Para una revisión de fragmentos scFv, véase, por ejemplo, Plueckthun, A., en; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994), pág. 269-315; véase también documento WO 93/16185; y patentes de Estados Unidos N.º 5.571.894 y 5.587.458. Para análisis de fragmentos de Fab F(ab')₂ que comprenden restos epitópicos de unión a receptor de recuperación y que tienen semivida *in vivo* aumentada, véase patente de Estados Unidos N.º 5.869.046.

Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpo con los sitios de unión a antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Véase, por ejemplo, documentos EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; y Holliger, P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. También se describen diacuerpos y tetracuerpos en Hudson, P.J. *et al.*, Nat. Med. 9 (2003) 129-134.

Los anticuerpos de único dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden todo o una parte del dominio variable de cadena pesada o todo o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En ciertas realizaciones, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, MA; véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 6.248.516 B1).

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo por diversas técnicas, incluyendo, pero sin limitación, digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como producción por células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), como se describe en el presente documento.

3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo quimérico. Ciertos anticuerpos quiméricos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; y Morrison, S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con "clase cambiada" en el que la clase o subclase se ha cambiado de la del anticuerpo parental. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad en seres humanos, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano parental. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que HVR, por ejemplo, CDR, (o partes de las mismas) derivan de un anticuerpo no humano, y FR (o partes de las mismas) derivan de secuencias de anticuerpo humano. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante humana. En algunas realizaciones, algunos restos FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con restos correspondientes de un

anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los restos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad de anticuerpo.

Los anticuerpos humanizados y métodos para prepararlos se revisan, por ejemplo, en Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann, I. *et al.*, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; patentes de Estados Unidos N.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri, S.V. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 25-34 (que describe injerto de SDR (a-CDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (que describe "cambio de superficie"); Dall'Acqua, W.F. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 43-60 (que describe "redistribución de FR"); y Osbourn, J. *et al.*, *Methods* 36 (2005) 61-68 y Klimka, A. *et al.*, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (que describe el enfoque de "selección guiada" para la redistribución de FR).

Las regiones marco conservadas humanas que pueden usarse para humanización incluyen, pero sin limitación: regiones marco conservadas seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (véase, por ejemplo, Sims, M.J. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; regiones marco conservadas derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (véase, por ejemplo, Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; y Presta, L.G. *et al.*, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); regiones marco conservadas maduras humanas (mutadas de forma somática) o regiones marco conservadas de línea germinal humana (véase, por ejemplo, Almagro, J.C. y Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); y regiones marco conservadas derivadas de exploración de bibliotecas de FR (véase, por ejemplo, Baca, M. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 y Rosok, M.J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Anticuerpos multiespecíficos

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Son anticuerpos multiespecíficos anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios diferentes. En ciertas realizaciones, una de las especificidades de unión es para teofilina y la otra es para cualquier otro antígeno. En ciertas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse con dos epítomos diferentes de teofilina. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan teofilina. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo.

Las técnicas para preparar anticuerpos multiespecíficos incluyen, pero sin limitación, coexpresión recombinante de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina que tienen especificidades diferentes (véase, Milstein, C. y Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, documento WO 93/08829, y Traunecker, A. *et al.*, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), e ingeniería de "botón en ojal" (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 5.731.168). También pueden prepararse anticuerpos multiespecíficos modificando técnicamente efectos de dirección electroestática para preparar moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpo (documento WO 2009/089004); reticulando dos o más anticuerpos o fragmentos (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 4.676.980, y Brennan, M. *et al.*, *Science* 229 (1985) 81-83); usando cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Kostelny, S.A. *et al.*, *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553; usando tecnología de "diacuerpos" para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (véase, por ejemplo, Holliger, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6444-6448); y usando dímeros de Fv monocatenario (sFv) (véase, por ejemplo, Gruber, M. *et al.*, *J. Immunol.* 152 (1994) 5368-5374); y preparar anticuerpos trispecíficos como se describe, por ejemplo, en Tutt, A. *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1991) 60-69).

También se incluyen en el presente documento anticuerpos modificados técnicamente con tres o más sitios de unión a antígeno funcionales, incluyendo "anticuerpos Octopus" (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0025576).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye un "Fab de acción doble" o "DAF" que comprende un sitio de unión a antígeno que se une con teofilina, así como otro antígeno diferente (véase, el documento US 2008/0069820, por ejemplo).

El anticuerpo o fragmento del presente documento también incluye anticuerpos multiespecíficos descritos en los documentos WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792 y WO 2010/145793.

5. Variantes de anticuerpo

En ciertas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo introduciendo modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede prepararse cualquier combinación de supresión, inserción y

sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

a) Variantes de sustitución, inserción y supresión

5 En ciertas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para mutagénesis de sustitución incluyen las HVR y FR. Se muestran sustituciones conservativas en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones ejemplares", y como se describe
10 adicionalmente posteriormente en referencia a clases de cadenas laterales de aminoácidos. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos explorarse con respecto a una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenicidad reducida o ADCC o CDC mejorada.

Tabla 1

Resto original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

15 Pueden agruparse aminoácidos de acuerdo con propiedades de cadenas laterales comunes:

- (1) Hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) Hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 20 (3) Ácidos: Asp, Glu;
- (4) Básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para estudio adicional tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) de ciertas propiedades
30 biológicas (por ejemplo, afinidad aumentada, inmunogenicidad reducida) en relación con el anticuerpo parental y/o

habrán conservado sustancialmente ciertas propiedades biológicas del anticuerpo parental. Una variante de sustitución ejemplar es un anticuerpo de afinidad madurada, que puede generarse convenientemente, por ejemplo, usando técnicas de maduración de afinidad basadas en presentación en fagos tales como las descritas en el presente documento. Brevemente, se mutan uno o más restos de HVR y los anticuerpos variantes se presentan en fagos y se exploran con respecto a una actividad biológica particular (por ejemplo, afinidad de unión).

Pueden realizarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpo. Dichas alteraciones pueden realizarse en "puntos calientes" de HVR, es decir, restos codificados por codones que experimentan mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (véase, por ejemplo, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), y/o SDR (a-CDR), ensayándose la variante resultante VH o VL con respecto a afinidad de unión. Se ha descrito la maduración de afinidad construyendo y reseleccionando de bibliotecas secundarias, por ejemplo, en Hoogenboom, H.R. *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. En algunas realizaciones de maduración de afinidad se introduce diversidad en los genes variables elegidos para maduración por cualquiera de una diversidad de métodos (por ejemplo, PCR propensa a errores, redistribución de cadenas o mutagénesis dirigida a oligonucleótido). Se crea después una biblioteca secundaria. La biblioteca se explora después para identificar cualquier variante con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se seleccionan aleatoriamente varios restos de HVR (por ejemplo, 4-6 restos a la vez). Los restos de HVR implicados en la unión a antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, usando mutagénesis de exploración de alanina o modelización. En particular se dirigen con frecuencia a CDR-H3 y CDR-L3.

En ciertas realizaciones, pueden realizarse sustituciones, inserciones o supresiones dentro de una o más HVR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse con antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse alteraciones conservativas (por ejemplo, sustituciones conservativas como se proporciona en el presente documento) que no reducen sustancialmente la afinidad de unión en HVR. Dichas alteraciones pueden estar fuera de los "puntos calientes" de HVR o SDR. En ciertas realizaciones de las secuencias de VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR está inalterada, o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificación de restos o regiones de un anticuerpo que puede ser diana de mutagénesis se denomina "mutagénesis de exploración de alanina" como se describe en Cunningham, B.C. y Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. En este método, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos con carga tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno está afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa, o adicionalmente, una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes pueden ser dianas o pueden eliminarse como candidatos para sustitución. Pueden explorarse variantes para determinar si contienen las propiedades deseadas.

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

Una variante preferida es una variante de cisteína individual en la que el resto de aminoácido en la posición 53 de acuerdo con Kabat en el dominio variable de cadena pesada es cisteína.

b) Variantes de glucosilación

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento se altera para aumentar o reducir la medida en ζ que el anticuerpo está glucosilado. La adición o supresión de sitios de glucosilación a un anticuerpo puede conseguirse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se creen o retiren uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido al mismo puede alterarse. Los anticuerpos nativos producidos por células de mamífero típicamente comprenden un oligosacárido ramificado, biantenarico, que está generalmente unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright, A. and Morrison, S.L., *TIBTECH* 15 (1997) 26-32. El oligosacárido puede incluir diversos carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura de oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden realizarse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo de la invención para crear variantes de anticuerpo con ciertas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpo que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en relación con la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y altas en manosa) como se mide por espectrometría de masas MALDI-TOF como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparagina localizado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración de EU de restos de región Fc); sin embargo, Asn297 también puede localizarse aproximadamente \pm 3 aminoácidos cadena arriba o cadena abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener función de ADCC mejorada. Véase, por ejemplo, documentos US 2003/0157108; US 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpo "desfucosiladas" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. *et al.*, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka, J. *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; documento US 2003/0157108; y WO 2004/056312, especialmente en el ejemplo 11), y líneas celulares con desactivación, tales como células CHO con desactivación del gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, *FUT8* (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki, N. *et al.*, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; y documento WO 2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpo con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarico unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona por GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener fucosilación reducida y/o función de ADCC mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpo, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878; patente de Estados Unidos N.º 6.602.684; y documento US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpo con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpo pueden tener función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpo se describen, por ejemplo, en los documentos WO 1997/30087; WO 1998/58964; y WO 1999/22764.

c) Variantes de región Fc

En ciertas realizaciones, pueden introducirse una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en el presente documento, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En ciertas realizaciones, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas, pero no todas las funciones efectoras, lo que la hace un candidato deseable para aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante pero ciertas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o deletéreas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (que carece por lo tanto probablemente de actividad ADCC), pero conserva capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan Fc (RIII) solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch, J.V. y Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Se describen ejemplos no limitantes de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente de Estados Unidos N.º 5.500.362 (véase, por ejemplo, Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; y Hellstrom, I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); Patente de Estados Unidos N.º 5.821.337 (véase Bruggemann, M. *et al.*, J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Como alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (véase, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radioactiva ACT1™ para citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad no radiactivo CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células citolíticas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes, R. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse con C1q y por lo tanto carece de actividad CDC. Véase, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en los documentos WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro, H. *et al.*, J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. *et al.*, Blood 101 (2003) 1045-1052; y Cragg, M.S. y M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). También pueden realizarse determinaciones de unión a FcRn y eliminación *in vivo*/semivida usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Petkova, S.B. *et al.*, Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen los que tiene sustitución de uno o más restos de región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente de Estados Unidos N.º 6.737.056). Dichos mutantes de Fc incluyen mutantes de Fc con sustituciones en dos o más de las posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, incluyendo el mutante de Fc denominado "DANA" con sustitución de restos 265 y 297 a alanina (Patente de Estados Unidos N.º 7.332.581).

Se describen ciertas variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos N.º 6.737.056; WO 2004/056312, y Shields, R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

En ciertas realizaciones, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de restos).

En algunas realizaciones, se realizan alteraciones en la región Fc que da como resultado unión a C1q alterada (es decir, mejorada o disminuida) y/ citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 6.194.551, WO 99/51642 e Idusogie, E.E. *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Se describen anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternos al feto (Guyer, R.L. *et al.*, J. Immunol. 117 (1976) 587-593, y Kim, J.K. *et al.*, J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), en el documento US 2005/0014934. Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc con FcRn. Dichas variantes Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los restos de región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, la sustitución del resto de región Fc 434 (patente de Estados Unidos N.º 7.371.826).

Véase también Duncan, A.R. y Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; documentos US 5.648.260; US 5.624.821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de región Fc.

d) Variantes de anticuerpos modificados técnicamente con cisteína

En ciertas realizaciones, puede ser deseable crear anticuerpos modificados técnicamente con cisteína, por ejemplo, "tioMAb", en los que uno o más restos de un anticuerpo se sustituyen con restos de cisteína. En realizaciones particulares, los restos sustituidos aparecen de sitios accesibles del anticuerpo. Sustituyendo esos restos con cisteína, se sitúan de este modo grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y pueden usarse para conjugar el anticuerpo con otros restos, tales como restos farmacológicos o restos farmacológicos-enlazador, para crear un inmunocombinado, como se describe adicionalmente en el presente documento. En ciertas realizaciones, pueden sustituirse uno cualquiera o más de los siguientes restos con cisteína: V205 (numeración de Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración de EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración de EU) de la región Fc de cadena pesada. Pueden generarse anticuerpos modificados técnicamente con cisteína como se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N.º 7.521.541.

e) Derivados de anticuerpo

En ciertas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para contener restos no proteicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetil celulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (bien homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usado para derivatización puede determinarse basándose en consideraciones incluyendo, pero sin limitación, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo para mejorar, si el derivado de anticuerpos usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

En otra realización, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteico que puede calentarse selectivamente por exposición a radiación. En una realización, el resto no proteico es un nanotubo de carbono (Kam, N.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, pero sin limitación, longitudes de onda que no dañan a células ordinarias, pero que calientan el resto no proteico a una temperatura a la que las células próximas al resto no proteico de anticuerpo se destruyen.

B. Métodos y composiciones recombinantes

Pueden producirse anticuerpos usando métodos y composiciones recombinantes, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4.816.567. En una realización, se proporciona ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti-teofilina descrito en el presente documento. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende el VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende el VH de un anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligeras y/o pesada del anticuerpo). En una realización adicional, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una realización adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se ha transformado con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende el VH del anticuerpo. En una realización, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una realización, se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-teofilina, en el que el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se ha proporcionado anteriormente, en condiciones adecuadas para expresiones del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de célula hospedadora).

Para producción recombinante de un anticuerpo antiteofilina, se aísla ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente con genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para clonación o expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en el presente documento. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos en bacterias, en particular cuando no son necesarias glucosilación y función efectora de Fc. Para expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, documentos US 5.648.237, US 5.789.199 y US 5.840.523. (Véase también Charlton, K.A., en: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*.) Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta celular bacteriana en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de procariotas, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras, incluyendo hongos y cepas de levadura cuyas rutas de glucosilación se han "humanizado", dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase, Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; y Li, H. *et al.*, *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células invertebradas incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden usarse junto con células de insecto, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse cultivos de células vegetales como hospedadores. Véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen tecnología de PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

También pueden usarse células de vertebrados como hospedadores. Por ejemplo, pueden ser útiles líneas celulares de mamífero que se han adaptado para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 como se describe, por ejemplo, en Graham, F.L. *et al.*, *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4 como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather, J.P. *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR- (Urlaub, G. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una revisión de ciertas líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas para producir anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki, P. y Wu, A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

C. Ensayos

Los anticuerpos anti-teofilina proporcionados en el presente documento pueden identificarse, explorarse o caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica.

Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, un anticuerpo de la invención se ensaya con respecto a su actividad de unión a antígeno, por ejemplo, por métodos conocidos tales como ELISA, transferencia de Western, etc.

En otro aspecto, los ensayos de competición pueden usarse para identificar un anticuerpo que compite con los anticuerpos como se indica en el presente documento por la unión con teofilina.

En un ensayo de competición ejemplar, la teofilina inmovilizada se incuba en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une con teofilina y un segundo anticuerpo no marcado que se ensaya con respecto a su capacidad para competir con el primer anticuerpo para unión con teofilina. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridoma. Como control, se incuba teofilina inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado, pero no el segundo anticuerpo no marcado. Después de incubación en condiciones permisivas para unión el primer anticuerpo con teofilina, se retira el anticuerpo no unido en exceso, y se mide la cantidad de marcador asociado con teofilina inmovilizada. Si la cantidad de marcador asociada con teofilina inmovilizada se reduce sustancialmente en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control, entonces esto indica que el segundo anticuerpo está compitiendo con el primer anticuerpo por la unión con teofilina. Véase, Harlow, E. y Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988).

D. Inmunoconjugados

La invención también proporciona Inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo anti-teofilina en el presente documento conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas proteicas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o isótopos radiactivos.

En una realización, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en el que un anticuerpo está conjugado con uno o más fármacos, incluyendo, pero sin limitación, maitansinoide (véase, documentos US 5.208.020, US 5.416.064 y EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos farmacológicos de monometil auristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (véase documentos US 5.635.483, US 5.780.588 y US 7.498.298); una dolastatina; una calicheamicina o derivado de la misma (véase documentos US 5.712.374, US 5.714.586, US 5.739.116, US 5.767.285, US 5.770.701, US 5.770.710, US 5.773.001 y US 5.877.296; Hinman, L.M. *et al.*, *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342; y Lode, H.N. *et al.*, *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (véase, Kratz, F. *et al.*, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. *et al.*, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. *et al.*, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343; y patente de Estados Unidos N.º 6.630.579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con una toxina enzimáticamente activa o fragmento de la misma, incluyendo, pero sin limitación, cadena A de difteria, fragmentos activos no de unión de toxina diftérica, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos.

En otra realización, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo como se describe en el presente documento conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Está disponible una diversidad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, R¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, TC^{99m} o I¹²³, o un marcador de espín para capturar imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como captura de imágenes por resonancia magnética, IRM), tal como yodo 123 de nuevo, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden prepararse conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales

como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzono). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se describe en Vitetta, E.S. *et al.*, Science 238 (1987) 1098-1104. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triamino pentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente quelante ejemplar para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un “enlazador escindible” que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Puede usarse, por ejemplo, un enlazador lábil por ácidos, enlazador sensible a peptidasa, enlazador fotolábil, enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro (Chari, R.V. *et al.*, Cancer Res. 52 (1992) 127-131; patente de Estados Unidos N.º 5.208.020).

Los inmunoconjugados o ADC en el presente documento contemplan expresamente, pero sin limitación, dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación incluyendo, pero sin limitación, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están disponibles en el mercado (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos).

E. Métodos y composiciones para diagnóstico y detección

El término “detectar” como se usa en el presente documento abarca detección cuantitativa o cualitativa.

En una realización, se proporciona un anticuerpo anti-teofilina para uso en un método de diagnóstico o detección. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*.

En ciertas realizaciones, se proporcionan anticuerpos anti-teofilina marcados. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o restos que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrón densos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, por ejemplo, mediante una reacción enzimática o interacción molecular. Los marcadores ejemplares incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I , fluoróforos tales como quelados de tierras raras o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, teofilina/avidina, marcadores de espín, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables y similares.

F. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo anti-teofilina como se describe en el presente documento mezclando dicho anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son en general no tóxicos para receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, pero sin limitación: tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecil dimetilbencilamonio; cloruro de hexamentonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menores de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como poli(vinilpirrolidona); aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los vehículos farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glucoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 solubles humanas, tales como rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Ciertas sHASEGP ejemplares y métodos de uso, incluyendo rhuPH20, se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glucosaminoglucanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen formulaciones de anticuerpos liofilizadas ejemplares en la patente de Estados Unidos N.º 6.267.958. Las formulaciones de anticuerpo acuosas incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos N.º 6.171.586 y el documento WO 2006/044908, incluyendo estas últimas formulaciones un tampón de histidina-acetato.

La formulación del presente documento también puede contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se trate, preferentemente, los que tienen actividades complementarias que no se

afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar adicionalmente [[enumerar fármacos que podrían combinarse con el anticuerpo anti-teofilina]]. Dichos principios activos están presentes, convenientemente, en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido.

5 Los principios activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metil metacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, micoremulciones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. (ed.) (1980).

10 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

15 Las formulaciones para usar para administración *in vivo* son generalmente estériles. La esterilidad puede conseguirse fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de esterilización por filtración.

G. Métodos y composiciones terapéuticos

20 Puede usarse cualquiera de los anticuerpos anti-teofilina proporcionados en el presente documento en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo anti-teofilina para uso como un medicamento. En ciertas realizaciones, se proporciona un anticuerpo anti-teofilina para uso en un método de tratamiento.

25 En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-teofilina en la fabricación o preparación de un medicamento.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-teofilina proporcionados en el presente documento. En una realización, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos anti-teofilina proporcionados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 Los anticuerpos de la invención pueden usarse solos o en combinación con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede coadministrarse con al menos un agente terapéutico adicional.

40 Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente abarcan administración combinada (en la que dos o más agentes terapéuticos se incluyen en las mismas formulaciones o formulaciones separadas) y administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo de la invención puede producirse antes de, simultáneamente, con y/o después de la administración del agente terapéutico y/o adyuvante adicional. También pueden usarse anticuerpos de la invención en combinación con radioterapia.

45 Un anticuerpo de la invención (y cualquier agente terapéutico adicional) puede administrarse por cualquier medio adecuado, incluyendo parenteral, intrapulmonar, e intranasal, y, si se desea para tratamiento local, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. La dosificación puede ser por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica. Se contemplan en el presente documento diversos programas de dosificación incluyendo, pero sin limitación, administraciones individuales o múltiples sobre diversos puntos temporales, administración de embolada e infusión por pulsos.

50 Se formularían, dosificarían y administrarían anticuerpos de la invención de una manera coherente con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen trastorno particular que se trata, el mamífero particular que se trata, la afección clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de suministro del agente, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos por los practicantes médicos. El anticuerpo se formula opcionalmente, aunque no es necesario, con uno o más agentes actualmente usados para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de dichos otros agentes depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores analizados anteriormente. Estos se usan en general en las mismas dosificaciones y con vías de administración como se describen en el presente documento, o aproximadamente de 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en el presente documento, o en cualquier dosificación y por cualquier vía que se determine de forma empírica/clínica que sea apropiada.

65 Para la prevención o el tratamiento de enfermedad, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la invención (cuando se use solo en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad para tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se

5 administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico a cargo. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tiempo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,5 mg/kg-10 mg/kg) de anticuerpo puede ser una dosificación candidata inicial para administración al paciente, bien, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o bien mediante infusión continua. Una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantendría en general hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación ejemplar del anticuerpo estaría en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Por lo tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) pueden administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de modo que el paciente reciba de aproximadamente 2 a aproximadamente 20, o, por ejemplo, aproximadamente 6 dosis del anticuerpo). Puede administrarse una dosis de carga inicial mayor, seguida de una o más dosis menores. El progreso de esta terapia se supervisa fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

20 Se entiende que cualquiera de las formulaciones anteriores o métodos terapéuticos pueden llevarse a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-teofilina.

20 III. Artículos de fabricación

25 En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador o prospecto en o asociado con el recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden formarse de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que está por sí sola o combinada con otra composición eficaz para el tratamiento, la prevención y/o el diagnóstico de la afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. El marcador o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección elegida. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un agente citotóxico adicional o de otro modo terapéutico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar una afección particular. Como alternativa, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección bacteriostática (BWFJ), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

45 Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación anteriores puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-teofilina.

45 IV. Ejemplos

50 Los siguientes son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden practicarse diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

50 Ejemplo 1

55 Aislamiento y caracterización de ADNc que codifican los dominios VH y VL de un anticuerpo anti-teofilina murino de clase IgG1 con cadena ligera kappa de hibridoma de ratón.

60 La información de secuencia de proteína y ADN de los dominios VH y VL del anticuerpo de teofilina-hapteno murino se obtuvo directamente de clones de hibridoma. Las etapas experimentales realizadas posteriormente fueron (i) el aislamiento de ARN de células de hibridoma productoras de anticuerpo, (ii) conversión de este ARN a ADNc, la transferencia a VH y VL que albergan fragmentos de PCR y (iii) integración de estos fragmentos de PCR en vectores plasmídicos para propagación en *E. coli* y determinación de sus secuencias de ADN (y proteína deducida).

Preparación de ARN a partir de células de hibridoma:

65 Se preparó ARN a partir de 5×10^6 células de hibridoma que expresaban anticuerpo aplicando el kit RNeasy (Qiagen). Brevemente, las células sedimentadas se lavaron una vez en PBS y se sedimentaron y posteriormente se resuspendieron para lisis en 500 µl de tampón RLT (+β-ME). Las células se lisaron completamente pasando a través

de un Qiashredder (Qiagen) y después se sometieron al procedimiento de purificación mediado por matriz (ETOH, columnas RNeasy) como se describe en el manual del fabricante. Después de la última etapa de lavado, se recuperó ARN de las columnas en 50 µl de agua sin RNAsa. La concentración del ARN recuperado se determinó mediante cuantificación A260 y A280 de muestras diluidas 1:20. La integridad (calidad, grado de degradación) de las muestras de ARN aisladas se realizó mediante electroforesis en gel de ARN desnaturalizante en geles de formamida-agarosa (véase, manuales de Maniatis). Se obtuvieron bandas discretas que representan los ARN ribosómicos 18s y 28s intactos y la integridad (y aproximadamente relaciones de intensidad 2:1) de estas bandas indicó una buena calidad de las preparaciones de ARN. Los ARN aislados de hibridoma se congelaron y se almacenaron a -80 °C en alícuotas.

Generación de fragmentos de ADN que codifican VH y VL por PCR RACE, clonación de estos fragmentos de ADN en plásmidos y determinación de sus secuencias de aminoácidos y ADN.

El ADNc para reacciones de PCR (RACE) posteriores se preparó a partir de preparaciones de ARN aplicando las tecnologías como se ha descrito en la solicitud de patente internacional PCT/EP2011/074273. Posteriormente, los fragmentos de PCR que codificaban VH y VL se aislaron mediante extracción en gel de agarosa y posterior purificación mediante técnicas de biología molecular convencionales. Se insertaron fragmentos de PCR purificados generados por PWO en el vector PCR bluntII topo aplicando el kit de pCR bluntII topo (Invitrogen) siguiendo con exactitud las instrucciones del fabricante. Las relaciones de topología se transformaron en células competentes *E. coli* Topo10-one-shot. A continuación, se identificaron clones *E. coli* que contenían vectores con insertos que contenían VL o VH como colonias en placas de agar de LB-Kanamicina. Se prepararon plásmidos a partir de estas colonias y se confirmó la presencia del inserto deseado en el vector mediante digestión de restricción con EcoRI. Debido a que la cadena principal del vector contiene sitios de reconocimiento de restricción de EcoRI que flanquean cada lado del inserto, se definieron plásmidos que albergaban insertos por tener insertos liberables por EcoRI de aproximadamente 800 pb (para VL) o 600 pb (para VH). La secuencia de ADN y la secuencia de proteína deducida del VH y VL se definieron mediante secuenciación de ADN automática en clones múltiples para VH y VL.

La secuencia de VL murina del anticuerpo anti-teofilina se representa en SEQ ID NO: 08. La secuencia de VH murina del anticuerpo anti-teofilina se representa en SEQ ID NO: 04.

Ejemplo 2

Humanización de los dominios VH y VL de anticuerpo anti-teofilina murino

El anticuerpo de unión a teofilina murino se humanizó de la siguiente manera: se generó un anticuerpo anti-teofilina humanizado basado en la combinación del marco conservado de línea germinal humana IGHV4-31-02 y IGKV2-30-01. El VH humanizado se basa en la línea germinal IGHV4-31-02 humana y el elemento J humano de la línea germinal IGHJ4-01-3. Se introdujo una retromutación en la región marco conservada en la posición 71 (V71R). El VL humanizado se basa en la línea germinal IGHV2-30-01 humana y el elemento J humano de la línea germinal IGKJ2-01. Se introdujo una retromutación en la región marco conservada 2 en la posición 46 (R46L). La secuencia de aminoácidos del VH humanizado se representa en SEQ ID NO: 12 y la secuencia de aminoácidos del VL humanizado se muestra en SEQ ID NO: 16.

Ejemplo 3

Composición, expresión y purificación de anticuerpos anti-teofilina recombinantes

Se combinaron regiones variables de anticuerpo anti-teofilina murinas y humanizadas con regiones constantes de origen humano para formar anticuerpos quiméricos o humanizados mono o biespecíficos.

La generación de anticuerpos anti-teofilina humanizados monoespecíficos y anticuerpos anti-teofilina humanizados biespecíficos que se unen específicamente con teofilina así como con una diana distinta de teofilina diferente (por ejemplo, tirosina quinasas receptoras o IGF-1R) requirió (i) el diseño y la definición de secuencias de aminoácidos y nucleótidos para dichas moléculas, (ii) expresión de estas moléculas en células de mamífero cultivadas transfectadas y (iii) purificaciones de estas moléculas de los sobrenadantes de células transfectadas. Estas etapas se realizaron como se ha descrito previamente en el documento PCT/EP2011/074273.

En general, para generar un anticuerpo humanizado de la clase IgG que tiene la especificidad de unión del anticuerpo anti-teofilina murino (original), se fusionó la secuencia de VH humanizada en fase con el extremo N terminal de CH1-bisagra-CH2-CH3 de una región Fc humana de la subclase IgG1. De forma similar, la secuencia de VL humanizada se fusionó en fase con el extremo N terminal de la región constante CLkappa humana.

Para generar derivados de anticuerpo biespecíficos que contienen la especificidad de unión a teofilina, así como especificidades con otras dianas, se fusionó el anticuerpo anti-teofilina, un fragmento scFv o Fab en fase con el extremo C terminal de la cadena pesada de anticuerpos previamente descritos. En muchos casos, el scFv

antihapteno aplicado se estabilizó adicionalmente mediante introducción de un enlace disulfuro VH44-VL 100 que se ha descrito previamente (por ejemplo, Reiter, Y., *et al.*, Nature biotechnology 14 (1996) 1239-1245).

Plásmidos de expresión

5 Los plásmidos de expresión comprenden casetes de expresión para la expresión de las cadenas pesada y ligera se ensamblaron por separado en vectores de expresión de células de mamífero.

10 Por lo tanto, los segmentos génicos que codifican los elementos individuales se unieron como se ha indicado anteriormente.

15 Se proporciona información general con respecto a las secuencias de nucleótidos de cadenas ligeras y pesadas humanas de la que puede deducirse el uso codónico en: Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), Publicación NIH N.º 91-3242.

La unidad de transcripción de la cadena ligera κ está compuesta de los siguientes elementos:

- 20 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (hCMV),
- un 5'-UT sintético que incluye una secuencia Kozak,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia señal,
- el ADNc de cadena ligera variable clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de corte y empalme y un sitio de restricción de NotI único en el extremo 3',
- 25 - la región constante de gen κ humana genómica, que incluye el potenciador de Ig- κ de ratón de intrón 2 (Picard, D. y Schaffner, W. Nature 307 (1984) 80-82), y
- la secuencia señal de κ -poliadenilación de inmunoglobulina humana ("poli A").

La unidad de transcripción de la cadena pesada de κ l está compuesta de los siguientes elementos:

- 30 - el potenciador temprano inmediato y promotor del citomegalovirus humano (hCMV),
- un 5'-UT sintético que incluye una secuencia Kozak,
- una secuencia señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluye el intrón de secuencia señal,
- 35 - el ADNc de cadena pesada variable monoespecífico clonado o el ADN de cadena pesada variable-scFv de fusión biespecífico clonado dispuestos con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donante de corte y empalme y un sitio de restricción de NotI único en el extremo 3',
- la región constante de γ l-pesado humano genómica, incluyendo el potenciador μ de Ig de ratón (Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378), y
- 40 - la secuencia señal de poliadenilación de γ l inmunoglobulina humana ("poliA").

Además del casete de expresión de cadena ligera κ o cadena pesada γ l estos plásmidos contienen

- un gen de resistencia a higromicina,
- un origen de replicación, oriP, de virus de Epstein-Barr (VEB),
- 45 - un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen de β -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina en *E. coli*.

Técnicas de ADN recombinante

50 Se realizó clonación usando técnicas de clonación convencionales como se describe en Sambrook *et al.*, 1999 (mencionado anteriormente). Todos los activos biológicos moleculares estaban disponibles en el mercado (si no se indica de otro modo) y se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

55 El ADN que contiene secuencias codificantes, mutaciones o elementos genéticos adicionales se sintetizó por Geneart AG, Regensburg.

Se determinaron secuencias de ADN mediante secuenciación bicatenaria realizada en SequiServe (SequiServe GmbH, Alemania).

60 Análisis de secuencia de ADN y proteína y control de datos de secuencia

Se usó el conjunto de programas Vector NTI Advance versión 9.0 para creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustración.

65

Expresión de anticuerpos anti-teofilina y derivados

Los anticuerpos anti-teofilina se expresaron mediante transfección transitoria de células de riñón embrionario humano 293 (HEK293). Por eso, se construyeron cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos mono o biespecíficos correspondientes en vectores de expresión que portaban marcadores de selección procariotas y eucariotas como se ha indicado anteriormente. Estos plásmidos se amplificaron *E. coli*, se purificaron y posteriormente se aplicaron para transfecciones transitorias. Se usaron técnicas de cultivo celular convencionales para manipulación de las células como se describe en Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. y Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc.

Las células se cultivaron en medio de expresión apropiado a 37 °C/CO₂ 8 %. El día de la transfección las células se sembraron en medio nuevo a una densidad de 1-2 x 10⁶ células viables/ml. Los complejos de ADN con reactivos de transfección se prepararon en medio Opti-MEM I (Invitrogen, Estados Unidos) que comprenden 250 µg de ADN transgénico de cadena pesada y ligera en una relación molar 1:1 para un volumen de transfección final de 250 µl. El anticuerpo monoespecífico o biespecífico que contiene sobrenadantes de cultivo celular se clarificó 7 días después de la transfección mediante centrifugación a 14.000g durante 30 minutos y filtración a través de un filtro estéril (0,22 µm). Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta su purificación.

Para determinar la concentración de anticuerpos y derivados en los sobrenadantes de cultivo celular, se aplicó cromatografía de HPLC de afinidad. Para eso, el sobrenadante de cultivo celular que contenía anticuerpo mono o biespecífico o derivados del mismo que se unen a proteína A se aplicó a una columna Applied Biosystems Poros A/20 en una solución que comprende KH₂PO₄ 20 mM, citrato sódico 100 mM, a pH 7,4. Se realizó elución del material de cromatografía aplicando una solución que comprendía NaCl 200 mM, ácido cítrico 100 mM, a pH 2,5. Se usó un sistema de HPLC UltiMate 3000 (Dionex). La proteína eluida se modificó mediante absorbancia de UV e integración de áreas pico. Un anticuerpo IgG1 purificado actuó como un patrón.

Purificación de anticuerpos anti-teofilina

Siete días después de la transfección se recogieron los sobrenadantes celulares de HEK 293. El anticuerpo recombinante contenido en los mismos se purificó del sobrenadante en dos etapas mediante cromatografía de afinidad usando cromatografía de afinidad de proteína A-Sepharose™ (GE Healthcare, Suecia) y cromatografía de expresión por tamaños Superdex200. Brevemente, el anticuerpo que contenía sobrenadantes de cultivo clarificados se aplicó en una columna de proteína MabSelectSuRe A (5-50 ml) equilibrada con tampón de PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 7,4). Las proteínas no unidas se lavaron con tampón de equilibrado. Los anticuerpos (o derivados) se eluyeron con tampón de citrato 50 mM, pH 3,2. Las fracciones que contenían proteínas se neutralizaron con 0,1 ml de tampón Tris 2 M, pH 9,0. Después, las fracciones de proteína eluidas se agruparon, se concentraron con un dispositivo de filtro de centrifugal Amicon Ultra (PCPM: 30 K, Millipore) y se cargaron en una columna de filtración en gel Superdex200 HiLoad 26/60 (GE Healthcare, Suecia) equilibrada con histidina 20 mM, NaCl 140 mM, a pH 6,0. La concentración de proteína de anticuerpos purificados y derivados se determinó determinando la densidad óptica (DO) a 280 nm con la DO a 320 nm como la corrección de fondo, usando el coeficiente de extinción molar calculado basándose en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con Pace *et al.*, Protein Science, 1995, 4, 2411-2423. Se agruparon fracciones de anticuerpos monoméricos, se congelaron instantáneamente y se almacenaron a -80 °C. Parte de las muestras se proporcionó para analítica y caracterización de proteínas posterior.

La homogeneidad de los anticuerpos se confirmó por SDS-PAGE en presencia y ausencia de un agente reductor (1,4-ditiotreitol 5 mM) y tinción con azul brillante de Coomassie. Se usó sistema de gel premoledado NuPAGE® (Invitrogen, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (geles de Tris-glicina 4-20 %).

En condiciones reductoras, se mostraron cadenas polipeptídicas relacionadas con el IgG tras SDS-PAGE a tamaños moleculares aparentes análogos a los pesos moleculares calculados. Los niveles de expresión de todas las construcciones se analizaron mediante proteína A. Los rendimientos de proteína promedio eran de entre 6 mg y 35 mg de proteína purificada por litro de sobrenadante de cultivo celular en dichos experimentos de expresión transitoria no optimizados.

La Figura 1 muestra análisis de SDS PAGE de los productos de expresión de anticuerpos quiméricos y humanizados que se unen con teofilina. La composición y homogeneidad de anticuerpos quiméricos y humanizados después de purificación con proteína A y SEC demuestran presencia de cadenas H y cadenas L de anticuerpo como bandas únicas sin presencia de cantidades visibles de contaminaciones de proteína adicional.

Ejemplo 4

Detección de unión específica del anticuerpo con teofilina

Para determinar la unión específica del anticuerpo por ELISA, se cargaron placas de ELISA recubiertas con estreptavidina con teofilina biotinilada (500 ng/ml en PBS) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura

ambiente. Después de lavar dos veces para retirar antígeno no unido, se añadieron anticuerpos a concentraciones entre 50 y 3.000 ng/ml (en PBS) y se incubaron durante 30 minutos. Después de lavar dos veces, se detectó anticuerpo unido con un conjugado de anti-huFc Fab-HRP y sustrato de ABTS (con medición de absorbancia a 405 nm). La Figura 2 muestra que el anticuerpo quimérico, así como el humanizado se unen específicamente y de forma dependiente de la dosis a teofilina que se inmoviliza en la placa de ELISA. Por el contrario, un anticuerpo de control que reconoce un antígeno (carbohidrato) diferente (LeY) no genera señales en este ensayo.

Para determinar la afinidad de unión específica del anticuerpo con teofilina, se aplicaron análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR). Los perfiles de unión de los anticuerpos de unión a teofilina se muestran en la Figura 3. Las afinidades calculadas (KD) son de 20 nM y 17 nM, respectivamente, para los anticuerpos murinos (fila superior) y humanizados (fila inferior) (véase siguiente tabla).

Tabla

ka	kd	KD	KD [nM]	t1/2 [min]
1,12E+05	0,00228	2,03E-08	20,3	5,1
1,31E+05	0,002214	1,70E-08	17,0	5,2

Ejemplo 5

Generación de complejos de anticuerpo anti-teofilina-teofilina covalentes

Para evaluar la formación de complejos de anticuerpo covalentes que utilizan teofilina y anticuerpos de unión a teofilina como sistema de reconocimiento de haptenos, se generó teofilina-Cys-Cy5 como carga útil fluorescente, aplicando en general las tecnologías de síntesis y purificación que se han descrito anteriormente. La composición del derivado de teofilina-Cys-Cy5 que se había sintetizado se muestra en la Figura 4. Para demostrar la formación de un enlace disulfuro covalente, se generaron anticuerpos de unión a teofilina que contenían una Cys diseñada en la posición 54 o 55 de la región variable de cadena pesada (anticuerpo anti-teofilina-Cys). La pureza de estos anticuerpos se muestra de forma ejemplar para la variante de Y54C en la Figura 4b). Estos derivados de anticuerpo formaron complejo con teofilina-Cys-Cy5 y se sometieron posteriormente a SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras como se ha descrito en el Ejemplo 3. En condiciones no reductoras, se detectó Cy5 en complejo con anticuerpo anti-teofilina con enlaces disulfuro mediante su fluorescencia asociada con cadena H dentro del gel de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 3. Esto se representa en la Figura 4c), que demuestra que se han formado complejos covalentes entre anticuerpos como consecuencia de la reacción de carga sencilla de la misma manera que se observaron los disulfuros cuando se usó Digoxigenina, Fluoresceína o Biotina como un hapteno. Estos complejos se disociaron como se esperaba tras la reducción, es decir, liberaron la carga útil de la cadena H solamente cuando el disulfuro se redujo (Figura 4c)).

Ejemplo 6

El anticuerpo de unión a teofilina se une con su antígeno con afinidad extremadamente alta

La afinidad de anticuerpo de unión a teofilina se evaluó mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial (BIAcore) (Figura 5). Se capturaron fragmentos Fab del anticuerpo en la microplaca mediante anti-huFab, seguido de exposición a carga útil que contenía mono-teofilina (Teopéptido). Se formaron complejos 1:1 definidos (Fab: carga útil de teofilina). Además de la unión rápida (velocidad de asociación), no se observó ninguna velocidad de disociación detectable, es decir, ninguna liberación relevante del antígeno unido.

Por lo tanto, el anticuerpo tuvo una afinidad inesperadamente alta de menos de un único dígito de pM, posiblemente menos de 1 pM (Figura 5). Ya que las velocidades de disociación no eran observables en estas condiciones experimentales, los valores exactos de k_D no pudieron determinarse (fuera de especificación = el anticuerpo no tuvo ninguna velocidad de disociación detectable). Por lo tanto, es posible que el anticuerpo tenga una afinidad tan alta como sub-picomolar.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> ANTICUERPOS ANTITEOFILINA Y MÉTODOS DE USO

<130> 31083 WO

<150> EP12174958.4

<151> 04-07-2012

<160> 33

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 1

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

15

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 2

Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

25

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 3

Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

35

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

40

<400> 4

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

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

ES 2 600 154 T3

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Phe Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 5
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 5

10 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

15 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 6

20 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

25 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 7

30 Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr
 1 5

35 <210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 8

ES 2 600 154 T3

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn
 20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Val Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Met Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly
 85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> HVR-H1 humanizado
 <400> 9

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5

15 <210> 10
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> HVR-H2 humanizado
 <400> 10

25 Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

30 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> HVR-H3 humanizado

35 <400> 11

ES 2 600 154 T3

Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

5 <210> 12
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> VH humanizado

<400> 12

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

15 <210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> HVR-L1 humanizado

25 <400> 13

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

30 <210> 14
<211> 7
<212> PRT

ES 2 600 154 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> HVR-L2 humanizado

5

<400> 14

Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

10

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> HVR-L3 humanizado

<400> 15

Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr
1 5

20

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL humanizado

30

<400> 16

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly
85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

35

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

ES 2 600 154 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> HVR-H1 VH53C
5
<400> 17

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
1 5

10 <210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> HVR-H2 VH53C

<400> 18

Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
20 **1 5 10 15**

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> HVR-H3 VH53C
30 <400> 19

Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

35 <210> 20
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> VH VH53C

<400> 20

ES 2 600 154 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Ile Gly Tyr Ile Arg Cys Ser Gly His Thr Gly Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Val Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> HVR-L1 VH53C
 <400> 21

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

15 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> HVR-L2 VH53C
 <400> 22

25 Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

30 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 600 154 T3

<223> HVR-L3 VH53C

<400> 23

5 Tyr Gln Gly Thr His Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> VL VH53C

15 <400> 24

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Asn
20 25 30

Asn Arg Tyr Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Tyr Gln Gly
85 90 95

Thr His Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 25

20 <211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

25

ES 2 600 154 T3

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

<210> 26
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26

5

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

10

ES 2 600 154 T3

<210> 27
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 27

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

ES 2 600 154 T3

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

ES 2 600 154 T3

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> 28
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

10

ES 2 600 154 T3

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 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> 29
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

10

ES 2 600 154 T3

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 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

ES 2 600 154 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

ES 2 600 154 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

ES 2 600 154 T3

				85					90					95	
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys
		115					120					125			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
	130					135					140				
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp
145					150					155					160
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe
				165					170					175	
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp
			180					185					190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
	210					215					220				
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys
225					230					235					240
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				245					250					255	
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
			260					265					270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
		275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
	290					295					300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
305					310					315					320
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys									
				325											

ES 2 600 154 T3

<210> 32
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

ES 2 600 154 T3

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 33
<211> 327
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

10

ES 2 600 154 T3

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Gly Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-teofilina en el que el anticuerpo comprende (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 01, (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 02, y (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 03, (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 05; (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 06; y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 07; en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado y comprende, en la posición 71 del dominio variable de cadena pesada numerado de acuerdo con Kabat, el resto de aminoácido arginina, y comprende, en la posición 46 del dominio variable de cadena ligera numerado de acuerdo con Kabat, el resto de aminoácido leucina.
- 10 2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende
- 15 (a) una secuencia de VH que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 04;
- (b) una secuencia de VL que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 08; o
- (c) una secuencia de VH como en (a) y una secuencia de VL como en (b),
- 20 en el que el resto de aminoácido en la posición 71 del dominio variable de cadena pesada numerado de acuerdo con Kabat es arginina y el resto de aminoácido en la posición 46 del dominio variable de cadena ligera numerado de acuerdo con Kabat es leucina.
- 25 3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 04.
4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que comprende una secuencia de VL de SEQ ID NO: 08.
5. Un anticuerpo que comprende una secuencia VH de SEQ ID NO: 04 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 08.
- 30 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa o un anticuerpo IgG4 de longitud completa.
7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo monoclonal.
- 35 8. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un fragmento de anticuerpo que se une con teofilina.
9. Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso como un medicamento.
11. Uso del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento.

Figura 1

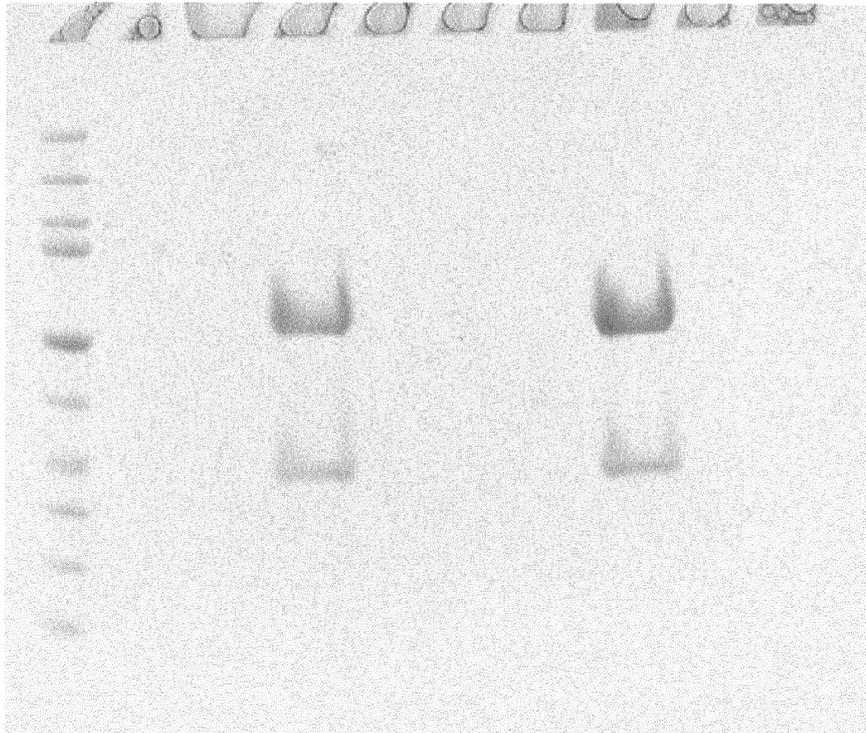


Figura 2

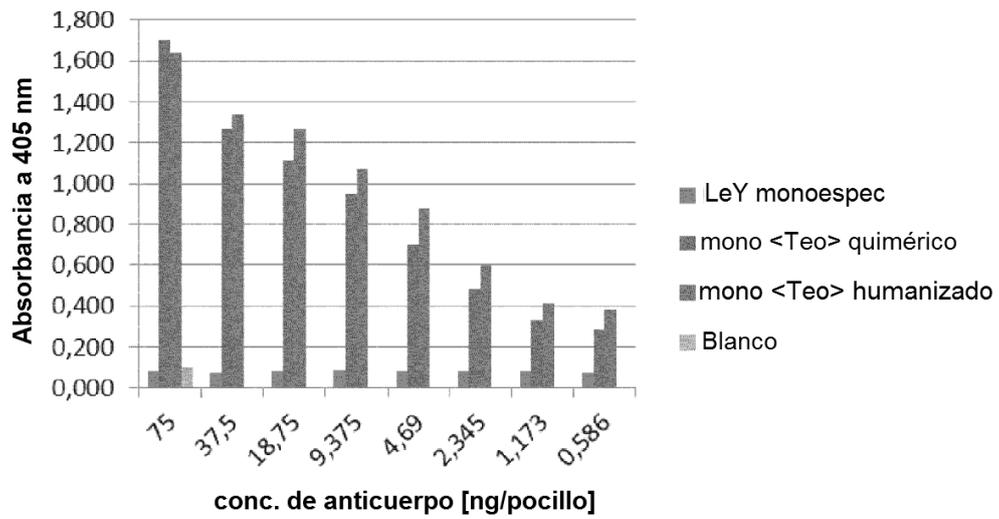


Figura 3

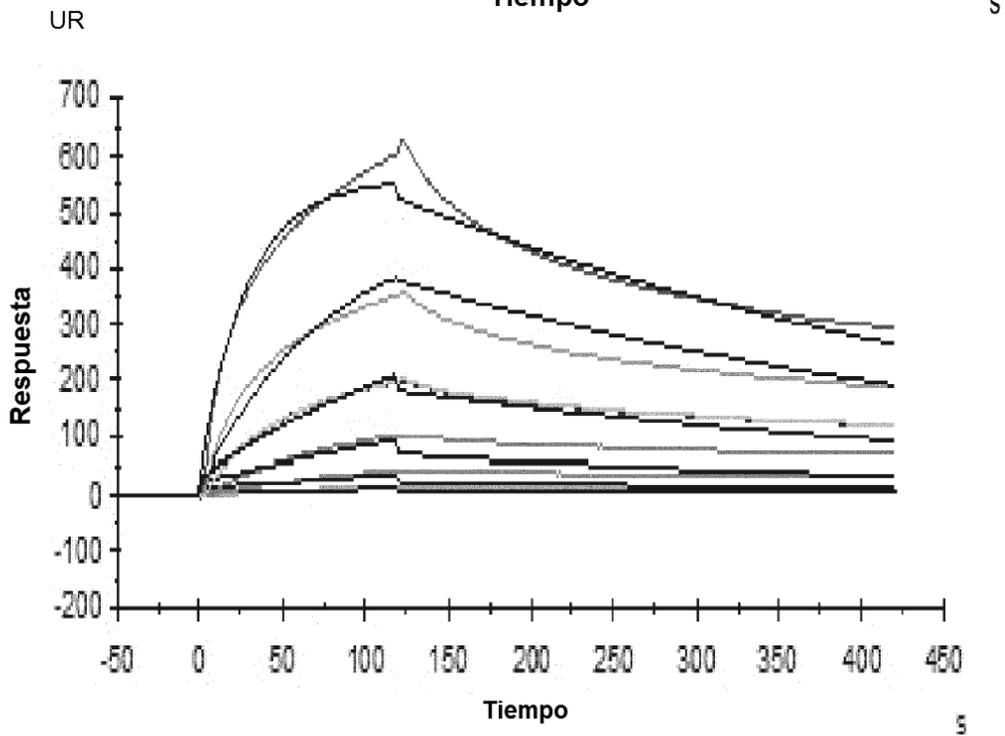
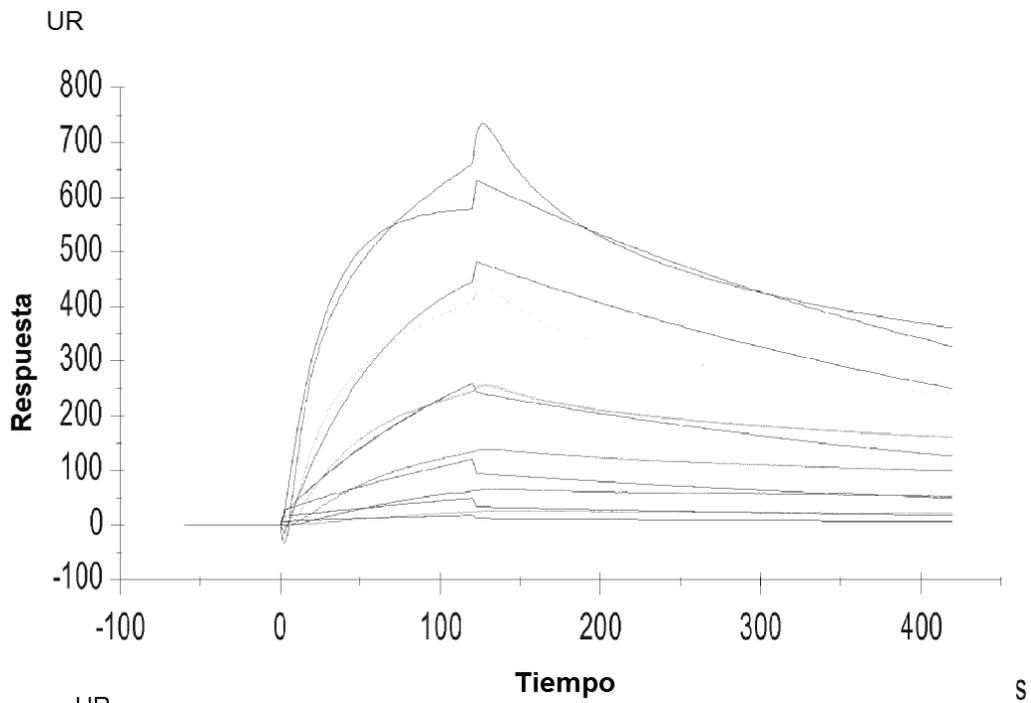
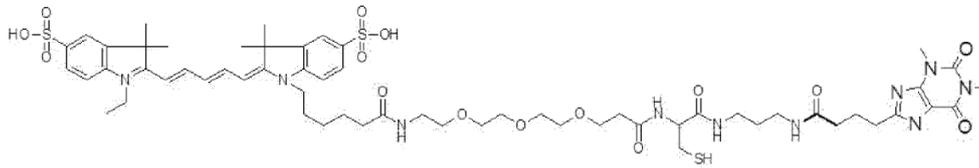


Figura 4

a)



Peso de fórmula: 1269,55(5)
 Fórmula: $C_{59}H_{84}N_{10}O_{15}S_3$

b)

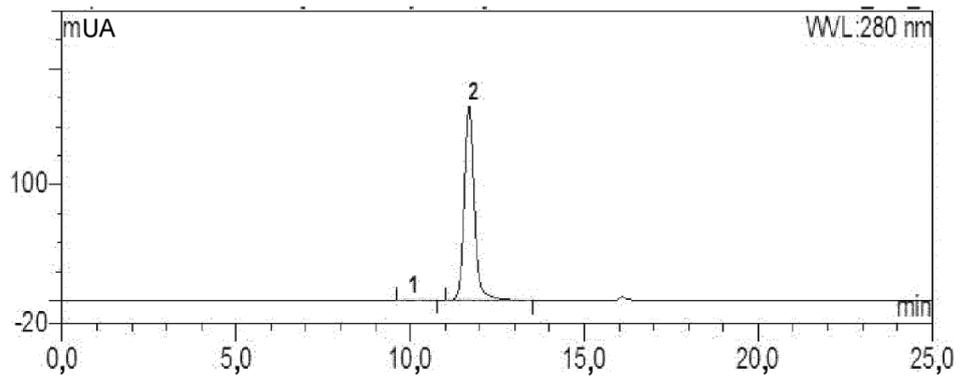


Figura 4 continuación

c)

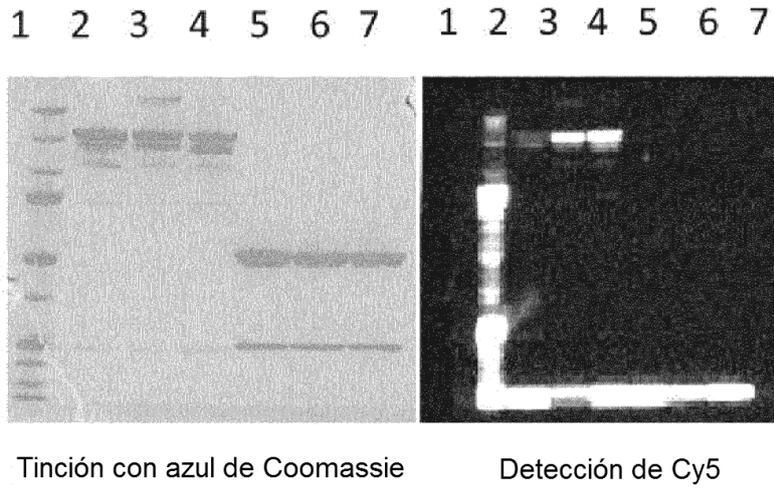


Figura 5

