

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 160**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.10.2011 PCT/GB2011/051884**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050725**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2011 E 11774087 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2764025**

54 Título: **Anticuerpos de IgE anti-HMW-MAA**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.02.2018

73 Titular/es:
IGEM THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
119 The Hub 300, Kensal Road
London W10 5BE, GB

72 Inventor/es:
KARAGIANNIS, SOPHIA;
BEAVIL, ANDREW y
NESTLE, FRANK

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 654 160 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos de IgE anti-HMW-MAA

Campo

5 La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos, y en particular a los anticuerpos terapéuticos para el tratamiento del cáncer, especialmente el cáncer de piel.

Antecedentes

10 El melanoma maligno es una forma inmunógena, sumamente agresiva y muy letal de cáncer de piel. Es el cáncer más frecuente en el grupo de edad de 17-34 años, pero afecta a personas de todas las edades, y por lo tanto tiene un impacto socioeconómico significativo para los pacientes y sus familias. Las tasas de melanoma han estado creciendo un 5% al año, más rápido que cualquier otro cáncer en el R.U. [1]. Aunque las lesiones cutáneas diagnosticadas se pueden extirpar inicialmente mediante intervención quirúrgica, desafortunadamente se dan metástasis cutáneas y distales en un 20% de los pacientes tratados en un principio con una enfermedad local. Los pacientes con metástasis distales en nódulos linfáticos y otras localizaciones tienen un pronóstico poco prometedor, y esto se debe parcialmente a la carencia de tratamientos eficaces para esta cohorte.

15 El melanoma ha representado un desafío importante en numerosos intentos de terapia selectiva, y por lo tanto se necesitan urgentemente tratamientos eficaces para los pacientes de esta enfermedad. La aprobación reciente del anticuerpo monoclonal ipilimumab (dirigido al bloqueo de CTLA4 para aumentar la activación de las células T) para el tratamiento del melanoma da mérito a la idea de que la activación de las respuestas inmunitarias con anticuerpos puede tener importancia terapéutica, y ha renovado el interés en el campo de las terapias con anticuerpos para el tratamiento de tumores desafiantes tales como el melanoma [2-4]. A pesar del éxito parcial y la promesa de diversas estrategias inmunoterapéuticas, que incluyen anticuerpos, en la actualidad no existen terapias prometedoras con anticuerpos que se dirijan directamente a antígenos de la superficie de las células de melanoma.

20 Los anticuerpos terapéuticos complementan en la actualidad los tratamientos convencionales de varias enfermedades malignas, pero casi todos los agentes desarrollados actualmente se basan solamente en una de las nueve clases de anticuerpos humanos, concretamente IgG₁, la clase de anticuerpo más abundante en la sangre [5]. El sistema inmunitario humano despliega de manera natural nueve clases y subclases de anticuerpos (IgM, IgD, IgG1-4, IgA1, IgA2 e IgE) para llevar a cabo la vigilancia inmunitaria y para mediar en la destrucción de patógenos en los diferentes compartimentos anatómicos. Aunque solamente se ha aplicado la IgG (con más frecuencia IgG1) en la inmunoterapia del cáncer.

30 Una razón puede ser que los anticuerpos de IgG (en particular IgG1) constituyen la mayor fracción de anticuerpos circulantes en la sangre humana. La elección de la clase de anticuerpo también se basa en un trabajo pionero de finales de los años 80, que comparaba un panel de anticuerpos quiméricos de la misma especificidad, cada uno con regiones Fc que pertenecían a una de las nueve clases y subclases de anticuerpos [6]. Los anticuerpos se estudiaron con respecto a su capacidad de unirse al complemento y su potencia en la mediación en la hemólisis y la citotoxicidad de las células objetivo que expresaban el antígeno en presencia del complemento. La IgG1 en combinación con las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas fue la subclase de IgG más eficaz en la destrucción de células dependiente del complemento *in vitro*, mientras los anticuerpos de IgA e IgE fueron completamente inertes.

40 Los ensayos clínicos posteriores con anticuerpos que reconocían el marcador de células B CD20 apoyaron la deducción de que IgG1 sería la subclase más adecuada para la inmunoterapia de pacientes con neoplasias malignas de las células B, tales como el linfoma no Hodgkin [7]. Desde esos estudios, las comparaciones de los efectos anti-tumorales mediante diferentes clases de anticuerpos se han limitado a IgG e IgM en los modelos murinos y en pacientes con neoplasias malignas linfoides, mientras se ha demostrado que IgA media en la ADCC *in vitro* e *in vivo* en modelos de linfoma en ratón [8-12]. Los anticuerpos de IgA e IgE, por otra parte, nunca se han ensayado en pacientes de cáncer.

45 Ahora se sabe que la muerte de células tumorales mediada por el complemento es solamente uno de varios mecanismos mediante los cuales los anticuerpos pueden mediar en la restricción del crecimiento tumoral [13]. Los mecanismos conocidos incluyen involucrar a moléculas efectoras inmunitarias por medio de sus regiones Fc para inducir la destrucción mediada por células inmunitarias de las células seleccionadas como objetivo mediante la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y la fagocitosis (ADCP). Los anticuerpos también pueden actuar directamente sobre las células tumorales para inhibir las rutas de señalización del crecimiento, inducir la apoptosis, restringir la proliferación y la diferenciación celular de las células tumorales, o bloquear la adhesión y migración de las células tumorales. Algunos anticuerpos se desarrollan para que reconozcan objetivos asociados a la vasculatura asociada a tumores para privar a los tumores de nutrientes vitales transportados por medio del riego sanguíneo, mientras otros atacan objetivos regulatorios inmunitarios (p.ej. CTLA-4 y PD-1R) para aumentar la activación de las células T y superar los elementos inmunosupresores de la respuesta inmunitaria [14, 15, 3]. También se ha concentrado un esfuerzo exhaustivo en el diseño de conjugados de anticuerpos para administrar cargas tóxicas en forma de enzimas activadoras de fármacos, citocinas o radionúclidos a los tumores

[16]. También se están ideando múltiples aproximaciones de modificación de anticuerpos para mejorar agentes terapéuticos validados, tales como trastuzumab, con el objetivo principal de optimizar la especificidad/afinidad hacia el antígeno y las funciones efectoras de los anticuerpos de IgG [17].

5 Karagiannis *et al* (Brit. J. Derm., 2011, vol. 164, n° 4, 922) informa que un anticuerpo humano (IgE) con especificidad hacia HMW-MAA media en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células cancerosas.

El documento WO2006100582 describe el anticuerpo monoclonal anti-HMW-MAA 225.28S.

El documento US20082260635 describe una terapia eficaz de xenoinjertos de cáncer de mama en ratones mediante el uso del anticuerpo anti-HMW-MAA 11BD-2E11-2.

10 Karagiannis *et al* (J. Imm., 2007, vol. 179, n° 5, páginas 2832-2843) informa que la inmunoterapia dependiente de anticuerpos de IgE de tumores sólidos mediante el uso del Ab quimérico de IgE MOv18 contra la proteína de unión de folato superó en gran medida a la IgG1 análoga en la promoción de la supervivencia.

15 Por lo tanto, todavía existe la necesidad de anticuerpos terapéuticos mejorados, en particular para el tratamiento de enfermedades neoplásicas tales como el cáncer de piel. En particular, existe la necesidad de anticuerpos que tengan funciones efectoras mejoradas en comparación con los anticuerpos de IgG, lo que puede conducir a un resultado clínico mejorado en el tratamiento del cáncer, especialmente del cáncer de piel.

Sumario

La materia de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

20 Por lo tanto, en un aspecto, la presente descripción proporciona un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, en el que el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo es capaz de unirse de manera específica al antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA), y unirse a un receptor de Fcε.

25 En una realización, el anticuerpo es del isotipo IgE. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento funcional del mismo puede comprender uno o más dominios constantes de la cadena pesada seleccionados de Cε1, Cε2, Cε3 y Cε4. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada ε. Así, en un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo de inmunoglobulina E que se une de manera específica al antígeno asociado al tumor, el antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA).

En otra realización, el anticuerpo comprende una o más regiones variables capaces de unirse de manera específica a HMW-MAA, y una o más regiones constantes capaces de unirse a un receptor de Fcε. En realizaciones específicas, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

30 En una realización, el anticuerpo comprende uno o más dominios variables derivados de un isotipo de inmunoglobulina distinto de IgE (p.ej., IgA, IgD, IgG o IgM, por ejemplo IgG1), y uno o más dominios constantes derivados de una inmunoglobulina del isotipo IgE.

En otra realización, el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) derivadas de un isotipo de inmunoglobulina distinto de IgE (p.ej. IgA, IgD, IgG o IgM, por ejemplo IgG1), y una o más regiones estructurales y/o dominios constantes derivados de una inmunoglobulina del isotipo IgE.

35 Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender uno o más dominios variables o regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) derivadas de una IgG, p.ej. IgG1.

40 En una realización, los dominios variables o las CDRs derivan de una primera especie de mamífero, y las regiones estructurales y/o los dominios constantes derivan de una segunda especie de mamífero diferente de la primera especie de mamífero. En una realización, las regiones variables o CDRs derivan de una especie no humana, p.ej. un ratón. En una realización alternativa, las regiones variables o CDRs derivan de una secuencia humana. Preferiblemente, las regiones estructurales y/o los dominios constantes son humanos.

En un aspecto adicional, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento funcional del mismo como se definió anteriormente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar a un sujeto que padece cáncer, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo o una composición farmacéutica como se definió anteriormente.

En otro aspecto, se proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento funcional del mismo o una composición farmacéutica como se definió anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

50 En otro aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento funcional del mismo o una composición farmacéutica como se definió anteriormente, para el uso en el tratamiento del cáncer.

Preferiblemente, el cáncer expresa HMW-MAA. En las realizaciones específicas, el cáncer puede ser cáncer de piel, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer de colon, glioma, cáncer de estómago o cáncer pancreático. En una realización preferida, el cáncer es melanoma maligno.

- 5 En otro aspecto, la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento funcional del mismo como se definió anteriormente. También se proporciona un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico unida de forma operable a un promotor, y una célula hospedadora transformada con el vector de expresión.

Breve descripción de los dibujos

- 10 Figura 1: A: Representaciones esquemáticas del diseño de vectores de la cadena pesada y ligera para la clonación de expresión de anticuerpos de IgG e IgE. B: Representación esquemática del diseño de anticuerpos de IgE e IgG₁ de la misma especificidad: las cadenas pesadas y ligeras variables de IgG₁ (izquierda, regiones indicadas con asteriscos) se insertaron en las regiones de la cadena pesada ϵ de IgE, y la cadena pesada ϵ se combinó con la cadena ligera κ para producir el anticuerpo de IgE correspondiente (derecha). Los sitios de glicosilación se representan mediante círculos negros.

- 15 Figura 2: Caracterización de los anticuerpos modificados de IgE (panel superior) e IgG₁ (panel inferior) específicos del antígeno de melanoma HMW-MAA. La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida nativa (izquierda) y reducida (medio) de los productos proteicos de IgE (superior) e IgG₁ (inferior) hacia HMW-MAA, comparado con los anticuerpos quiméricos caracterizados previamente de IgE e IgG₁ MOv18. Derecha: Perfiles de elución de los anticuerpos purificados en columna de afinidad mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño.

- 20 Figura 3: Histogramas de citometría de flujo que muestran la unión HMW-MAA-IgE. A: Unión de la IgE quimérica a células tumorales de melanoma A375 (izquierda) pero no a melanocitos (derecha). B: Unión de IgE a células monocíticas U937 (izquierda) y a melanocitos primarios (derecha). La unión del anticuerpo se detectó mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti-IgE humana-FITC. C: Histogramas de citometría de flujo que muestran la unión HMW-MAA-IgG a células tumorales de melanoma A375 (izquierda) y células monocíticas U937 (derecha). La unión del anticuerpo se detectó mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti-IgG humana-FITC.

- 25 Figura 4: Especificidad de unión de anticuerpos de IgE e IgG₁ hacia HMW-MAA a células tumorales de melanoma A375 frente a anticuerpos de IgE e IgG₁ específicos de un hapteno de control de isotipo. Los anticuerpos unidos a las células tumorales se detectaron mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti-IgE humana-FITC. Las imágenes se capturaron mediante el uso de un objetivo de 63x de inmersión en aceite. Barra de escala = 20 μm .

- 30 Figura 5: La IgE hacia HMW-MAA estimula la desgranulación funcional detectada (tal como se mide mediante la liberación de β -hexosaminidasa) de células RBL SX-38 tras el entrecruzamiento con un anticuerpo policlonal anti-IgE humana (A). Los ensayos de viabilidad celular con MTS exploraron los efectos directos potenciales de los anticuerpos anti-HMW-MAA sobre la proliferación de células tumorales de melanoma (B). Los efectos sobre la proliferación se compararon con los de trastuzumab (IgG₁), que se sabe que reduce la proliferación de las células tumorales.

- 35 Figura 6: Los ensayos de ADCC/ADCP confirmaron que la IgG₁ (izquierda) e IgE (derecha) anti-HMW-MAA actuaron como mediadores en niveles significativos de ADPC y ADCC, respectivamente, de células tumorales A375 mediante células monocíticas (n=5; * p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ns: p>0,05).

- 40 Figura 7: Análisis inmunohistoquímico de un modelo de tumor subcutáneo de células de melanoma A375 metastásicas, con marcaje de la expresión del marcador de melanoma HMW-MAA (izquierda) y del anticuerpo de control de isotipo de IgG de ratón (derecha). Las imágenes se capturaron mediante el uso de un objetivo de 10x.

- 45 Figura 8: Ensayo de anticuerpos modificados mediante el uso del modelo de tumor de melanoma subcutáneo. A: Monitorización del crecimiento subcutáneo (mm^3) de tumores de melanoma en diferentes puntos de tiempo tras la exposición al tumor (n=7). B: Medidas de la masa tumoral (mg) al final del estudio (30 días) para cada grupo de tratamiento.

Figura 9: La IgE y las células inmunitarias humanas se incorporan a las lesiones de melanoma de ratones tratados con IgE específica del antígeno de melanoma, pero no a las lesiones de animales tratados con un anticuerpo quimérico inespecífico.

- 50 Figura 10: Secuencia de aminoácidos de HMW-MAA humano (SEQ ID N°:1).

Figura 11: Secuencia de ácido nucleico que codifica HMW-MAA humano (SEQ ID N°:2).

Figura 12: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:3) que codifica la región variable de la cadena pesada (V_H) de scFv (225.28S), como se publicó previamente en Neri D, et al. (1996), Recombinant anti-human melanoma antibodies are versatile molecules, J Invest Dermatol 107: 164-170.

Figura 13: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:4) de la región variable de la cadena pesada (V_H) de scFv (225.28S), como se publicó previamente en Neri D, et al. (1996) anteriormente mencionado.

Figura 14: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:5) que codifica la región variable de la cadena ligera (V_L) de scFv (225.28S), como se publicó previamente en Neri D, et al. (1996) anteriormente mencionado.

- 5 Figura 15: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:6) de la región variable de la cadena ligera (V_L) de scFv (225.28S), como se publicó previamente en Neri D, et al. (1996) anteriormente mencionado.

Figura 16: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:7) de la cadena pesada (ϵ) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante. Negrita: Región variable (derivada de scFv (225.28S)). Subrayado: Región constante (región constante ϵ humana).

- 10 Figura 17: Secuencia de aminoácidos (SEQ ID N°:8) de la cadena ligera (κ) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante. Negrita: Región variable (derivada de scFv (225.28S)). Subrayado: Región constante (región constante κ humana).

- Figura 18: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:9) que codifica la cadena pesada (ϵ) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante. Negrita: Parte que codifica la región variable (derivada de scFv (225.28S)). Subrayado: Parte que codifica la región constante (región constante ϵ humana).
- 15

Figura 19: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:10) que codifica la cadena ligera (κ) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante. Negrita: Parte que codifica la región variable (derivada de scFv (225.28S)). Subrayado: Parte que codifica la región constante (región constante κ humana).

- Figura 20: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:11) que comprende optimizaciones de codones humanos, que codifica la región variable de la cadena pesada (V_H) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante.
- 20

Figura 21: Secuencia de ácido nucleico (SEQ ID N°:12) que comprende optimizaciones de codones humanos, que codifica la región variable de la cadena ligera (V_L) del anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA quimérico, como se describe en el Ejemplo más adelante.

- Figura 22: Secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios constantes de la cadena pesada (ϵ) de inmunoglobulina humana, como se describen en la base de datos del NCBI, número de acceso L00022.1. A: $CH_{(\epsilon)}1$ (SEQ ID N°:13); B: $CH_{(\epsilon)}2$ (SEQ ID N°:14); C: $CH_{(\epsilon)}3$ (SEQ ID N°:15); D: $CH_{(\epsilon)}4$ (SEQ ID N°:16).
- 25

Figura 23: Secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio constante de la cadena ligera (κ) humana (SEQ ID N°:17).

- Figura 24: Localización de las CDR y las regiones estructurales dentro del dominio variable de la cadena pesada (V_H) presentes en el mAb 225.28s y los anticuerpos de IgE anti-HMW-MAA quiméricos.
- 30

Figura 25: Localización de las CDR y las regiones estructurales dentro del dominio variable de la cadena ligera (V_L) presentes en el mAb 225.28s y los anticuerpos de IgE anti-HMW-MAA quiméricos.

Descripción detallada

- 35 Antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA)

Los anticuerpos para el uso según la presente invención se unen al antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA). HMW-MAA también se conoce como proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma (MCSP), "proteoglicano de melanoma humano" (HMP), "antígeno de proteoglicano asociado a melanoma" (MPG) y "proteoglicano de sulfato de condroitina de melanoma" (mel-CSPG). HMW-MAA también se conoce como CSPG4. HMW-MAA es un proteoglicano de sulfato de condroitina asociado a melanoma humano que desempeña un papel en la estabilización de las interacciones célula-sustrato durante los sucesos tempranos de diseminación de células de melanoma en las membranas basales endoteliales.

40

Así, HMW-MAA representa un proteoglicano de sulfato de condroitina de membrana integral expresado por las células de melanoma maligno humano. *In vivo*, está presente en una molécula que consiste en dos glicopolipéptidos asociados de manera no covalente. Uno tiene un peso molecular aparente de 280 K, y el otro tiene un peso molecular aparente mayor de 440 K.

45

HMW-MAA se sintetiza y se expresa en las células de melanoma humano (Spiro, R. C. *et al.* F. Biol. Chem. 264:1779 (1989); Esko, J. D., *et al.*, Science 241:1092, 1988). Los proteoglicanos son glicoproteínas con cadenas de polisacárido glicosaminoglicano (GAG) unidas de manera covalente al residuo de serina de su núcleo. La proteína del núcleo de HMW-MAA se traduce inicialmente como un precursor con una masa molecular de 240 K con oligosacáridos unidos en N de asparagina del tipo de contenido elevado de manosa.

50

En una realización, HMW-MAA tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N°:1. La secuencia de aminoácidos de HMW-MAA también se describe en la base de datos del NCBI, n° de acceso NP_001888.2 y la entrada de SwissProt n° Q6UVK1.

5 En una realización, HMW-MAA está codificado mediante una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID N°:2. La secuencia de ácido nucleico que codifica HMW-MAA también se describe en la base de datos del NCBI, n° de acceso NM_001897.4.

10 Los anticuerpos descritos en la presente memoria se unen de manera específica a HMW-MAA. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden unir (p.ej. por medio de el/los sitio(s) de unión específica al antígeno o paratopos del anticuerpo, que están presentes en las regiones variables) a un epítipo antigénico presente en la proteína HMW-MAA. En general, el anticuerpo se puede unir a HMW-MAA con una afinidad elevada, p.ej. con una constante de disociación (K_d) menor de 1 μ M, preferiblemente menor de 1 nM. Preferiblemente, el anticuerpo se une de manera específica a HMW-MAA y no se une significativamente a antígenos no relacionados.

15 La afinidad de unión del anticuerpo hacia HMW-MAA se puede calcular mediante el uso de métodos habituales, p.ej. basados en el método de Scatchard como se describió en Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979. La afinidad de unión se puede medir también calculando la velocidad de disociación antígeno/anticuerpo, mediante un radioinmunoensayo competitivo, mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), o mediante resonancia de plasmones superficiales.

Anticuerpos

20 Los anticuerpos son ligandos polipeptídicos que comprenden al menos una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce y se une de manera específica a un epítipo de un antígeno, tal como HMW-MAA, o un fragmento del mismo. Los anticuerpos están compuestos en general de una cadena pesada y ligera, cada una de las cuales tiene una región variable, denominada región pesada variable (VH) y región ligera variable (VL). Juntas, la región VH y la región VL son responsables de la unión al antígeno reconocido por el anticuerpo.

25 Los anticuerpos incluyen las inmunoglobulinas intactas y las variantes y porciones de anticuerpos bien conocidos en la técnica, con tal de que tales fragmentos sean capaces de unirse al receptor de Fc ϵ . Los anticuerpos también incluyen formas genéticamente modificadas, tales como anticuerpos quiméricos, humanizados (por ejemplo, anticuerpos humanizados con secuencias murinas contenidas en las regiones variables) o humanos, anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos), p.ej. como se describió en Kuby, J., Immunology, 3^a Ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

30 En general, una inmunoglobulina natural tiene cadenas pesadas (H) y cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Existen nueve isotipos o clases principales que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgA1-2, IgD, IgE, IgG1-4 e IgM, que corresponden a los tipos de cadenas pesadas α , δ , ϵ , γ , y μ . Así, el tipo de cadena pesada presente define la clase de anticuerpo. Las diferentes cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Las diferencias en las regiones constantes de cada tipo de cadena pesada explican las diferentes funciones efectoras de cada isotipo de anticuerpo, en virtud de su unión selectiva a tipos particulares de receptores (p.ej., receptores de Fc). Por lo tanto, en las realizaciones de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada épsilon (ϵ), es decir, el anticuerpo es del isotipo IgE, que se une a receptores de Fc ϵ .

35 Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones se conocen también como "dominios"). En combinación, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se unen de manera específica al antígeno. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "estructural" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDRs". Se ha definido la extensión de la región estructural y las CDRs (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). La base de datos de Kabat se mantiene actualmente en Internet. Las secuencias de las regiones estructurales de las diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas en una especie, tal como en los seres humanos. La región estructural de un anticuerpo, es decir, las regiones estructurales combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para colocar y alinear las CDRs en el espacio tridimensional.

40 Las CDRs son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDRs de cada cadena se denominan en general CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas secuencialmente comenzando desde el extremo N-terminal, y también se identifican en general mediante la cadena en la que está localizada la CDR particular. Así, una CDR3 de VH está localizada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se halla, mientras una CDR1 de VL es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se halla.

55 Los anticuerpos que se unen a HMW-MAA pueden tener una secuencia específica de la región VH y VL, y así secuencias específicas de CDR. Los anticuerpos con especificidades diferentes (es decir, sitios de combinación diferentes para antígenos diferentes) tienen CDRs diferentes. Aunque son las CDRs las que varían de anticuerpo a

anticuerpo, solamente un número limitado de posiciones de aminoácidos en las CDRs están implicados directamente en la unión al antígeno. Estas posiciones de las CDRs se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDRs). Así, en las realizaciones de la presente invención, el anticuerpo comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (p.ej. 3 CDRs de la cadena pesada y/o 3 CDRs de la cadena ligera), o al menos un dominio variable (p.ej. un dominio VH o VL) derivado de un anticuerpo que se une a HMW-MAA.

Las referencias a "VH" se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las referencias a "VL" se refieren a la región variable de una cadena ligera de inmunoglobulina.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido mediante un único clon de linfocitos B o mediante una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un único anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos para los expertos en la técnica, por ejemplo produciendo células híbridas que forman anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias de bazo. Los anticuerpos monoclonales incluyen los anticuerpos monoclonales humanizados.

Un "anticuerpo quimérico" comprende secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que en general derivan de especies diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos pueden incluir dominios de anticuerpos humanos y murinos, p.ej. regiones constantes humanas y regiones variables murinas (p.ej. de un anticuerpo murino que se une de manera específica a HMW-MAA).

Los anticuerpos quiméricos en general se construyen fusionando regiones variables y constantes, p.ej. mediante ingeniería genética, de genes de inmunoglobulinas de la cadena ligera y pesada que pertenecen a especies diferentes. Por ejemplo, los segmentos variables de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes humanos, tales como κ y ϵ . En un ejemplo, un anticuerpo quimérico terapéutico es por tanto una proteína híbrida compuesta del dominio variable o de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón, y el dominio constante o efector de un anticuerpo humano, p.ej. un dominio Fc (efector) de un anticuerpo de IgE humano, aunque se puede usar otra especie de mamífero, o la región variable se puede producir mediante técnicas moleculares. Los métodos de producción de anticuerpos quiméricos se conocen bien en la técnica, p.ej., véase la pat. de EE.UU. nº 5.807.715.

Un anticuerpo "humanizado" es un anticuerpo que incluye regiones estructurales humanas y una o más CDRs de un anticuerpo no humano (por ejemplo de ratón, rata, o sintético). La inmunoglobulina no humana que proporciona las CDRs se denomina "donante", y la inmunoglobulina humana que proporciona la región estructural se denomina "acceptora". En una realización, todas las CDRs son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. Las regiones constantes en general son sustancialmente idénticas a las regiones constantes de una inmunoglobulina humana, es decir, idénticas al menos alrededor del 85-90%, tal como alrededor del 95% o más. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto las CDRs, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de las secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales.

Un anticuerpo humanizado comprende en general una cadena ligera de inmunoglobulina humanizada y una cadena pesada de inmunoglobulina humanizada. Un anticuerpo humanizado se une en general al mismo antígeno que el anticuerpo donante que proporciona las CDRs. La región estructural aceptora de una inmunoglobulina o anticuerpo humanizado puede tener un número limitado de sustituciones con aminoácidos tomados de la región estructural donante. Los anticuerpos monoclonales humanizados o de otro tipo pueden tener sustituciones conservativas de aminoácidos adicionales, que no tienen un efecto sustancial sobre la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina.

Se pueden construir inmunoglobulinas humanizadas por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la pat. de EE.UU. nº 5.585.089). En general, los anticuerpos monoclonales humanizados se producen transfiriendo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo donante desde las cadenas variables pesadas y ligeras de una inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano, y después sustituyendo los residuos humanos en las regiones estructurales de los homólogos donantes. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos monoclonales humanizados evita problemas potenciales asociados a la inmunogenicidad de las regiones constantes del anticuerpo donante. Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados se describen, por ejemplo, en Jones et al., *Nature* 321:522, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332:323, 1988; Verhoeven et al., *Science* 239:1534, 1988; Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285, 1992; Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; y Singer et al., *J. Immunol.* 150:2844, 1993.

Un anticuerpo "humano" (también denominado anticuerpo "completamente humano") es un anticuerpo que incluye regiones estructurales humanas y todas las CDRs de una inmunoglobulina humana. En un ejemplo, las regiones estructurales y las CDRs son de la misma secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas y/o ligeras humanas originales. Sin embargo, las regiones estructurales de un anticuerpo humano se pueden modificar para que incluyan las CDRs de un anticuerpo humano diferente.

En las realizaciones de la presente invención, los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o policlonales, lo que incluye anticuerpos quiméricos, humanizados o completamente humanos.

Anticuerpos que se unen a HMW-MAA

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se une de manera específica a HMW-MAA para formar un complejo inmunitario. En general, el anticuerpo puede comprender una región de unión al antígeno (p.ej. una o más regiones variables, o una a 6 CDRs) derivadas de un anticuerpo que se sabe que se une a HMW-MAA, preferiblemente HMW-MAA humano.

- 5 Los anticuerpos que se unen a HMW-MAA se describen, por ejemplo, en el documento WO 89/11296. Tales anticuerpos incluyen los anticuerpos monoclonales de ratón 225.28s; 763.74; VF1-TP41.2; VT80.112; 653.25; 763.74; TP61.5 y T8-203 (véase el documento WO 89/11296; Drake et al., Cancer Immunol. Immunother. DOI 10: 1007, s00262-008-0567-5, 2008; Goto et al., Clin. Cancer Res. 14: 3401-3407, 2008).

- 10 En una realización específica, el anticuerpo comprende una región variable (p.ej. un dominio variable de la cadena pesada (VH) y/o un dominio variable de la cadena ligera (VL)) o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (p.ej. 3 CDRs de la cadena pesada o 3 CDRs de la cadena ligera) del anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) 225.28s. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL del mAb 225.28s se muestran en SEQ ID N°:4 y SEQ ID N°:6, respectivamente, y las secuencias de ácido nucleico correspondientes que codifican estos dominios se muestran en SEQ ID N°:3 y SEQ ID N°:5, respectivamente. Las secuencias de las CDRs de la cadena pesada y ligera del mAb 225.28s se muestran en las Figuras 24 y 25, respectivamente, y en SEQ ID N°s: 18 a 20 y 21 a 23, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano que se une de manera específica al epítipo unido por mAb 225.28s.

- 20 En otro ejemplo específico, el anticuerpo comprende una región variable (p.ej. un dominio variable de la cadena pesada y/o un dominio variable de la cadena ligera) o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (p.ej. 3 CDRs de la cadena pesada o 3 CDRs de la cadena ligera) del mAb 763.74, o es un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano que se une de manera específica al epítipo unido por el mAb 763.74.

- 25 En otro ejemplo, el anticuerpo comprende una región variable (p.ej. un dominio variable de la cadena pesada y/o un dominio variable de la cadena ligera) o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (p.ej. 3 CDRs de la cadena pesada o 3 CDRs de la cadena ligera) derivadas de un clon de células B humanas que reconocen un epítipo hallado en HMW-MAA, preferiblemente HMW-MAA humano.

- 30 En una realización, el anticuerpo comprende una o más regiones constantes humanas, p.ej. uno o más dominios constantes de la cadena pesada humana (p.ej. dominios constantes ϵ) y/o un dominio constante de la cadena ligera humana (p.ej. κ o λ). Se muestra una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de la cadena ligera humana (κ) en SEQ ID N°:17. Más preferiblemente, el anticuerpo comprende una o más regiones estructurales humanas en los dominios VH y/o VL.

- 35 En una realización, la secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada puede ser idéntica en al menos alrededor del 65% respecto de la secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina donante. Así, la secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina humanizada puede ser idéntica en al menos alrededor del 75%, al menos alrededor del 85%, al menos alrededor del 99% o al menos alrededor del 95%, respecto de la secuencia de la región estructural de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina donante. Las regiones estructurales humanas, y las mutaciones que se pueden hacer en las regiones estructurales del anticuerpo humanizado, se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, la pat. de EE.UU. n° 5.585.089).

- 40 Se describen anticuerpos completamente humanos y fragmentos de los mismos que se unen a HMW-MAA en el documento WO 2010/045495, p.ej. un fragmento de scFv aislado de una biblioteca de anticuerpos de scFv de expresión en fagos semisintética y denominada C21. En ciertas realizaciones, el anticuerpo puede comprender un dominio variable de la cadena pesada y/o un dominio variable de la cadena ligera o al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis CDRs (p.ej. 3 CDRs de la cadena pesada o 3 CDRs de la cadena ligera) de scFv C21.

- 45 También se pueden generar anticuerpos adicionales hacia las secuencias de HMW-MAA mediante métodos bien establecidos, y se pueden usar al menos las regiones variables o CDRs de tales anticuerpos en los anticuerpos de la presente invención (p.ej., los anticuerpos generados se pueden usar para donar CDRs o secuencias de las regiones variables a secuencias aceptoras de IgE). Los métodos para sintetizar polipéptidos e inmunizar a un animal hospedador son muy conocidos en la técnica. En general, al animal hospedador (p.ej. un ratón) se le inocula de manera intraperitoneal una cantidad de inmunógeno (es decir, HMW-MAA o un polipéptido que comprende un fragmento inmunógeno del mismo), y (en el caso de la producción de anticuerpos monoclonales) se preparan hibridomas a partir de sus linfocitos y células de mieloma inmortalizadas mediante el uso de la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) Nature 25 6:495-497.

- 55 Los hibridomas que producen los anticuerpos adecuados se pueden cultivar *in vitro* o *in vivo* mediante el uso de procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales se pueden aislar a partir de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como la precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía, y ultrafiltración, si se desea. La actividad indeseada, si está presente, se puede eliminar, por ejemplo, haciendo pasar la preparación a lo largo de

adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados el inmunógeno. Si se desea, se puede secuenciar el anticuerpo (monoclonal o policlonal) de interés, y la secuencia polinucleotídica se puede clonar después en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede mantener en un vector en una célula hospedadora, y la célula hospedadora se puede expandir después y congelarla para uso futuro.

La tecnología de expresión en fagos, por ejemplo como se describió en el documento US 5.565.332 y otros documentos publicados, se puede usar para seleccionar y producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donantes sin inmunizar (p.ej., de sujetos humanos, lo que incluye pacientes que padecen un trastorno relevante). Por ejemplo, las bibliotecas existentes de expresión en fagos de anticuerpos se pueden cribar en paralelo respecto de una gran colección de polipéptidos sintéticos. Según esta técnica, se clonan los genes de los dominios variables V de los anticuerpos en el marco de lectura en el gen de la proteína de revestimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd, y se expresan en forma de fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, las secuencias de anticuerpos seleccionadas mediante el uso de la expresión en fagos de bibliotecas humanas pueden incluir secuencias humanas de CDRs o de regiones variables que confieren una unión específica a HMW-MAA, que se pueden usar para proporcionar anticuerpos completamente humanos para el uso en la presente invención.

Los métodos para obtener secuencias de la cadena pesada y ligera a partir de clones de células B y células plasmáticas humanas también se conocen bien en la técnica, y en general se llevan a cabo mediante el uso de técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se describen ejemplos de los métodos en: Kuppers R, *Methods Mol Biol.* 2004;271:225-38; Yoshioka M et al., *BMC Biotechnol.* 21 de jul. de 2011;11:75; Scheeren FA et al., *PLoS ONE* 2011, 6(4): e17189. doi:10.1371/journal.pone.0017189; Wrammert J et al., *Nature* 2008 453, 667-671; Kurosawa N et al., *BMC Biotechnol.* 13 de abr. de 2011;11:39; Tiller et al., *J Immunol Methods.* 1 de enero de 2008; 329(1-2): 112-124. Así, las secuencias de anticuerpos seleccionadas mediante el uso de clones de células B pueden incluir secuencias humanas de CDRs o de la región variable que confieren una unión específica a HMW-MAA, que se pueden usar para proporcionar anticuerpos completamente humanos para el uso en la presente invención.

Anticuerpos que se unen a receptores de Fcε

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también son capaces de unirse a receptores de Fcε, p.ej. a los receptores FcεRI y/o FcεRII. Preferiblemente, el anticuerpo al menos es capaz de unirse a FcεRI (es decir, el receptor de Fcε de elevada afinidad), o al menos es capaz de unirse a FcεRII (CD23, el receptor de Fcε de baja afinidad). En general, los anticuerpos también son capaces de activar los receptores de Fcε, p.ej. expresados en las células del sistema inmunitario, para iniciar las funciones efectoras mediadas por IgE.

La cadena pesada épsilon (ε) es característica de los anticuerpos de IgE, y comprende un dominio variable N-terminal VH, y cuatro dominios constantes Cε1-Cε4. Como ocurre con otros isotipos de anticuerpos, los dominios variables confieren la especificidad hacia el antígeno, y los dominios constantes incorporan las funciones efectoras específicas del isotipo.

IgE difiere de los isotipos IgG más abundantes, ya que es incapaz de fijarse al complemento y no se une a los receptores de Fc FcγRI, RII y RIII expresados en las superficies de las células mononucleares, las células NK y los neutrófilos. Sin embargo, la IgE es capaz de interactuar de manera muy específica con el receptor de IgE de "elevada afinidad" en una diversidad de células inmunitarias, tales como los mastocitos, basófilos, monocitos/macrófagos, eosinófilos (FcεRI, $K_a 10^{11} M^{-1}$), y con el receptor de "baja afinidad", Fcε RII ($K_a 10^7 M^{-1}$), también conocido como CD23, expresado en las células inflamatorias y las células presentadoras de antígenos (p.ej., monocitos/macrófagos, plaquetas, células dendríticas, linfocitos T y B).

Los sitios en IgE responsables de estas interacciones con receptores se han cartografiado en las secuencias peptídicas en la cadena Cε, y son diferentes. El sitio de FcεRI se halla en una hendidura creada por los residuos entre Gln 301 y Arg 376, e incluye la unión entre los dominios Cε2 y Cε3 [Helm, B. et al. (1988) *Nature* 331, 180183]. El sitio de unión de FcεRII se localiza en Cε3 alrededor del residuo Val 370 [Vercelli, D. et al. (1989) *Nature* 338, 649-651]. Una diferencia importante distintiva los dos receptores es que FcεRI se une a Cε monomérico, mientras FcεRII se unirá solamente a Cε dimerizado, es decir, las dos cadenas Cε deben estar asociadas. Aunque la IgE está glicosilada *in vivo*, no es necesario para su unión a FcεRI y FcεRII. La unión es, de hecho, ligeramente más fuerte sin glicosilación [Vercelli, D. et al. (1989) et al., anteriormente mencionado].

Así, la unión a los receptores de Fcε y las funciones efectoras relacionadas en general están mediadas por los dominios constantes de la cadena pesada del anticuerpo, en particular por los dominios que forman juntos la región Fc del anticuerpo. Los anticuerpos descritos en la presente memoria comprenden en general al menos una porción de un anticuerpo de IgE, p.ej. uno o más dominios constantes derivados de una IgE, preferiblemente una IgE humana. En las realizaciones particulares, los anticuerpos comprenden uno o más dominios (derivados de IgE) seleccionados de Cε1, Cε2, Cε3 y Cε4. En una realización, el anticuerpo comprende al menos Cε2 y Cε3, más

preferiblemente al menos Cε2, Cε3 y Cε4, preferiblemente en el que los dominios derivan de una IgE humana. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada épsilon (ε), preferiblemente una cadena pesada ε humana.

5 Las secuencias de nucleótidos que codifican los dominios constantes derivados de una IgE humana, en particular los dominios Cε1, Cε2, Cε3 y Cε4, se muestran en SEQ ID N°s: 13, 14, 15 y 16, respectivamente, y se describen en la base de datos del NCBI, n° de acceso L00022.1. Las secuencias de aminoácidos que corresponden a estas secuencias de ácido nucleico las puede deducir una persona experta según el código genético, y también se indican en la base de datos del NCBI, n° de acceso L00022.1. La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada (ε) de longitud completa codificada por la combinación de SEQ ID N°s: 13, 14, 15 y 16 también se muestra en la Figura 16 (SEQ ID N°:7, parte subrayada). Las secuencias de aminoácidos de otras IgEs humanas y de mamífero y los dominios de las mismas, que incluyen los dominios Cε1, Cε2, Cε3 y Cε4 humanos y las secuencias de la cadena pesada ε humana, se conocen en la técnica y están disponibles de bases de datos accesibles públicamente. Por ejemplo, las bases de datos de las secuencias de inmunoglobulinas humanas son accesibles en el sitio de Internet del International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®) en <http://www.imgt.org>. Como ejemplo, las secuencias de diversos alelos de la cadena pesada (ε) de IgE humana y sus dominios constantes individuales (Cε1-4) son accesibles en http://www.imgt.org/IMGT_GENE-DB/GENEelect?query=2+IGHE&species=Homo+sapiens.

Anticuerpos anti-HMW-MAA preferidos que se unen a receptores de Fcε

20 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende un dominio VH codificado mediante una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una porción de SEQ ID N°: 3 o SEQ ID N°:11, p.ej. que comprende al menos 50, 100, 200, 300 o 350 nucleótidos de SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:11, o la longitud completa de SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:11. En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende un dominio VH que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID N°:4, p.ej. que comprende al menos 20, 30, 50 o 100 aminoácidos de SEQ ID N°:4 o la longitud completa de SEQ ID N°:4.

25 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende un dominio VL codificado mediante la secuencia de nucleótidos que comprende al menos una porción de SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N°:12, p.ej. que comprende al menos 50, 100, 200, o 300 nucleótidos de SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:12, o la longitud completa de SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°:12. En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA tiene un dominio VL que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID N°:6, p.ej. que comprende al menos 20, 30, 50 o 100 aminoácidos de SEQ ID N°:6 o la longitud completa de SEQ ID N°:6.

30 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una cadena pesada codificada mediante una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una porción de SEQ ID N°: 9, p.ej. que comprende al menos 100, 500, 1000 o 1500 nucleótidos de SEQ ID N°:9 o la longitud completa de SEQ ID N°:9. En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una cadena pesada que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID N°:7, p.ej. que comprende al menos 50, 100, 300 o 500 aminoácidos de SEQ ID N°:7 o la longitud completa de SEQ ID N°:7.

35 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una cadena ligera codificada mediante una secuencia de nucleótidos que comprende al menos una porción de SEQ ID N°: 10, p.ej. que comprende al menos 50, 100, 300 o 500 nucleótidos de SEQ ID N°:10 o la longitud completa de SEQ ID N°:10. En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una cadena ligera que comprende al menos una porción de la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID N°:8, p.ej. que comprende al menos 50, 100, 150 o 200 aminoácidos de SEQ ID N°:8.

40 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada codificados mediante al menos una porción de SEQ ID N°:13, SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15 y/o SEQ ID N°:16, p.ej. codificados mediante al menos 50, 100, 200 o 300 nucleótidos, o mediante la secuencia de longitud completa, de uno o más de SEQ ID N°s: 13 a 16. En una realización específica, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende un dominio constante de la cadena pesada codificado mediante SEQ ID N°:13, SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15 y SEQ ID N°:16.

45 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende un dominio constante de la cadena ligera codificado mediante al menos una porción de SEQ ID N°:17, p.ej. codificado mediante al menos 50, 100, 200 o 300 nucleótidos, o mediante la secuencia de longitud completa, de SEQ ID N°:17.

50 En una realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una o más secuencias de CDR de la cadena pesada seleccionadas de GFTFSNYW (SEQ ID N°:18), IRLKSNNFGR (SEQ ID N°:19) y TSYGNYVGHYFDH (SEQ ID N°:20). En otra realización, el anticuerpo anti-HMW-MAA comprende una o más secuencias de CDR de la cadena ligera seleccionadas de QNVDTN (SEQ ID N°:21), SAS (SEQ ID N°:22) y QQYNSYPLT (SEQ ID N°:23). Preferiblemente, el anticuerpo comprende una CDR1 de la cadena pesada que comprende (SEQ ID N°:18), una CDR2 de la cadena pesada que comprende (SEQ ID N°:19), una CDR3 de la cadena pesada que comprende (SEQ ID N°:20), una CDR1 de la cadena ligera que comprende (SEQ ID N°:21), una CDR2 de la cadena ligera que comprende (SEQ ID N°:22) y/o una CDR3 de la cadena ligera que comprende (SEQ ID N°:23).

En general, se pueden usar fragmentos funcionales de las secuencias definidas anteriormente en la presente descripción. Los fragmentos funcionales pueden ser de cualquier longitud, tal como se especificó anteriormente (p.ej. al menos 50, 100, 300 o 500 nucleótidos, o al menos 50, 100, 200 o 300 aminoácidos), con tal de que el fragmento conserve la actividad necesaria cuando esté presente en el anticuerpo (p.ej. la unión específica a HMW-MAA y/o un receptor de Fcε).

También se pueden usar variantes de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos anteriores en la presente descripción, con tal de que el anticuerpo resultante se una a HMW-MAA y a un receptor de Fcε. En general, tales variantes tienen un grado elevado de identidad de secuencia con una de las secuencias especificadas anteriormente.

La similitud entre las secuencias de aminoácidos o nucleótidos se expresa con respecto a la similitud entre las secuencias, denominada de otra manera identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia con respecto a la identidad en porcentaje (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de la secuencia de aminoácidos o nucleótidos poseerán un grado relativamente elevado de identidad de secuencia al alinearlos mediante el uso de los métodos habituales.

Los métodos de alineación de secuencias para la comparación se conocen bien en la técnica. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73:237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6:119, 1994, presenta un estudio detallado de los métodos de alineación de secuencias y de los cálculos de homología.

La herramienta de búsqueda de alineaciones locales básicas (BLAST) del NCBI (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403, 1990) está disponible de varias fuentes, que incluyen el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Md.) y en Internet, para el uso en relación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Hay disponible una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia mediante el uso de este programa en el sitio del NCBI en Internet.

Los homólogos y las variantes del anticuerpo anti-HMW-MAA o un dominio del mismo (p.ej. un dominio VL, VH, CL o CH) tienen en general al menos alrededor del 75%, por ejemplo al menos alrededor del 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la secuencia original (p.ej. una secuencia definida anteriormente), por ejemplo contada a lo largo de la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o dominio del mismo mediante el uso de Blast 2.0 del NCBI, Gapped Blastp ajustado con los parámetros por defecto. Para las comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de alrededor de 30 aminoácidos, se emplea la función Blast 2 Sequences mediante el uso de la matriz BLOSUM62 por defecto ajustada con los parámetros por defecto (coste de existencia de hueco de 11, y un coste de hueco por residuo de 1). Cuando se alinean péptidos cortos (menos de alrededor de 30 aminoácidos), la alineación se debería llevar a cabo mediante el uso de la función Blast 2 Sequences, mediante el empleo de la matriz PAM30 ajustada con los parámetros por defecto (penalizaciones por apertura de hueco 9, por prolongación de hueco 1). Las proteínas con una similitud aún mayor respecto de las secuencias de referencia mostrarán identidades en porcentaje crecientes al estudiarlas mediante este método, tal como al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, o al menos un 99% de identidad de secuencia. Cuando se compara menos de la secuencia completa con respecto a la identidad de secuencia, los homólogos y variantes poseerán en general al menos un 80% de identidad de secuencia a lo largo de ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden poseer identidades de secuencia de al menos un 85% o al menos un 90% o 95%, dependiendo de su similitud respecto de la secuencia de referencia. Los métodos para determinar la identidad de secuencia a lo largo de tales ventanas cortas están disponibles en el sitio del NCBI en Internet. Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidades de secuencia se proporcionan como guía solamente; es completamente posible que se pudieran obtener homólogos muy significativos que se hallasen fuera de los intervalos proporcionados.

En general, las variantes pueden contener una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en comparación con la secuencia original de aminoácidos o de ácido nucleico. Las sustituciones conservativas son las sustituciones que no afectan o disminuyen sustancialmente la afinidad de un anticuerpo hacia HMW-MAA y/o los receptores de Fcε. Por ejemplo, un anticuerpo humano que se une de manera específica a HMW-MAA puede incluir hasta 1, hasta 2, hasta 5, hasta 10, o hasta 15 sustituciones conservativas en comparación con la secuencia original (p.ej. como se definió anteriormente), y conservar la unión específica al polipéptido HMW-MAA. La expresión variación conservativa también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido original sin sustituir, con tal de que el anticuerpo se una de manera específica a HMW-MAA. Las sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o unión a HMW-MAA y/o los receptores de Fcε.

Los aminoácidos funcionalmente similares que se pueden intercambiar a modo de sustitución conservativa son muy conocidos para alguien de experiencia habitual en la técnica. Los seis grupos siguientes son ejemplos de aminoácidos que se considera que son sustituciones conservativas entre sí: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); 2) Ácido Aspártico (D), Ácido Glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Producción de anticuerpos anti-HMW-MAA y ácidos nucleicos

5 Las moléculas de ácido nucleico (también denominadas polinucleótidos) que codifican los polipéptidos proporcionados en la presente memoria (que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos) las puede producir fácilmente un experto en la técnica, mediante el uso de las secuencias de aminoácidos proporcionadas en la presente memoria, las secuencias disponibles en la técnica, y el código genético. Además, un experto puede construir fácilmente una diversidad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican la misma secuencia de molécula efectora o anticuerpo. Así, en la presente memoria se proporcionan ácidos nucleicos que codifican anticuerpos.

10 Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos que se unen de manera específica a HMW-MAA, o los fragmentos funcionales de los mismos que se unen de manera específica a HMW-MAA, se pueden preparar mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, la clonación de secuencias adecuadas o mediante síntesis química directa con métodos tales como el método de fosfotriéster de Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981; el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetra. Letts. 22(20):1859-1862, 1981, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador automatizado como se describe, por ejemplo, en Needham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984; y el método de soporte sólido de la pat. de EE.UU. nº 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa con el uso de la molécula monocatenaria como molde. Un experto reconocería que aunque la síntesis química de ADN se limita en general a secuencias de alrededor de 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligadura de secuencias más cortas.

25 Los ácidos nucleicos ejemplares que codifican anticuerpos que se unen de manera específica a HMW-MAA, o los fragmentos funcionales de los mismos que se unen de manera específica a HMW-MAA, se pueden preparar mediante técnicas de clonación. Los ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación adecuadas y las instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación se hallan, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., suplemento de 1995)). La información de los productos de fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Tales fabricantes incluyen SIGMA Chemical Company (Saint Louis, Mo.), R&D Systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia Amersham (Piscataway, N.J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (Carlsbad, Calif.), y Applied Biosystems (Foster City, Calif.), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas para un experto.

40 Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-HMW-MAA nativos se pueden modificar para formar los anticuerpos descritos en la presente memoria. La modificación mediante mutagénesis dirigida se conoce bien en la técnica. Los ácidos nucleicos se pueden preparar también mediante métodos de amplificación. Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencias autosostenida (3SR). Los expertos conocen una amplia diversidad de métodos de clonación, células hospedadoras, y metodologías de amplificación *in vitro*.

45 En una realización, los anticuerpos se preparan insertando un cADN que codifica uno o más dominios del anticuerpo (p.ej. una región variable de la cadena pesada de IgG1 de ratón que se une a HMW-MAA humana) en un vector que comprende un cADN que codifica uno o más dominios de anticuerpo adicionales (p.ej. una región constante de la cadena pesada ϵ humana). La inserción se hace de forma que los dominios del anticuerpo se leen en el marco de lectura, es decir, en un polipéptido continuo que contiene una región de anticuerpo funcional.

50 En una realización, el cADN que codifica una región constante de la cadena pesada se liga a una región variable de la cadena pesada, de forma que la región constante está localizada en el extremo carboxilo del anticuerpo. Las regiones variables y/o constantes de la cadena pesada se pueden ligar posteriormente a una región variable y/o constante de la cadena ligera del anticuerpo mediante el uso de enlaces disulfuro.

55 Una vez que los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo anti-HMW-MAA o fragmento funcional del mismo se han aislado y clonado, la proteína deseada se puede expresar en una célula modificada de manera recombinante, tal como células bacterianas, vegetales, de levadura, de insecto y de mamífero. Se espera que los expertos en la técnica conozcan los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas, que incluyen *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras, y diversas células eucarióticas superiores, tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y células de mieloma.

Se puede expresar una o más secuencias de ADN que codifican el anticuerpo o fragmento del mismo *in vitro* mediante transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada. La célula puede ser procariótica o eucariótica. El término también incluye la progenie de la célula hospedadora en cuestión. Se entiende que la progenie puede no ser idéntica a la célula original, ya que puede haber mutaciones que se den durante la replicación. Los métodos de transferencia estable, que significa que el ADN exógeno se mantiene de manera continua en el hospedador, se conocen en la técnica. Los hibridomas que expresan los anticuerpos de interés también están incluidos en esta descripción.

La expresión de los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos aislados y los fragmentos de anticuerpos descritos en la presente memoria se puede conseguir uniendo de manera operable el ADN o cADN a un promotor (que es constitutivo o inducible), seguido de la incorporación en un casete de expresión. Los casetes pueden ser adecuados para la replicación y la integración en procariotas o eucariotas. Los casetes de expresión típicos contienen secuencias específicas útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína. Por ejemplo, los casetes de expresión pueden incluir promotores adecuados, potenciadores, terminadores de la transcripción y traducción, secuencias de inicio, un codón de inicio (es decir, ATG) delante de un gen que codifica una proteína, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada del mRNA, y codones de parada.

Para obtener una expresión de nivel elevado de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para el inicio traduccional, y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli*, esto incluye un promotor, tal como los promotores T7, trp, lac, o lambda, un sitio de unión al ribosoma, y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucarióticas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y/o un potenciador derivado, por ejemplo, de un gen de inmunoglobulina, SV40 o citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir además secuencias donantes yceptoras de corte y empalme. Los casetes se pueden transferir a la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos, tales como transformación o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato cálcico, electroporación o lipofección para las células de mamífero. Las células transformadas con los casetes se pueden seleccionar mediante la resistencia a antibióticos conferida por los genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo y hyg.

Cuando el hospedador es un eucariota, se pueden usar métodos de transfección de ADN tales como la coprecipitación con fosfato cálcico, procedimientos mecánicos convencionales, tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o vectores virales. Las células eucarióticas también se pueden cotransformar con secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo, anticuerpo marcado, o un fragmento funcional del mismo, y una segunda molécula de ADN exógeno que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de timidina quinasa de herpes simple. Otro método es usar un vector viral eucariótico, tal como el virus simio 40 (SV40) o papilomavirus bovino, para infectar o transformar de manera transitoria células eucarióticas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Un experto en la técnica puede usar fácilmente un sistema de expresión, tal como plásmidos y vectores útiles en la producción de proteínas en células, lo que incluye las células eucarióticas superiores, tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y las células de mieloma.

Se pueden hacer modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria (es decir, un anticuerpo monoclonal específico de HMW-MAA humano) sin disminuir su actividad biológica. Se pueden hacer ciertas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la molécula selectiva en una proteína de fusión. Tales modificaciones son muy conocidas para los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo aminoterminal para proporcionar un sitio de inicio, aminoácidos adicionales colocados en cada extremo para crear sitios de restricción localizados de manera conveniente, o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación. Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos de la presente descripción también se pueden construir completamente o parcialmente mediante el uso de síntesis de péptidos estándar, muy conocida en la técnica.

Una vez expresados, los anticuerpos recombinantes se pueden purificar según los procedimientos habituales de la técnica, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, y similares (véase, en general, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y., 1982). No es necesario que los anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas efectoras sean puras al 100%. Una vez purificadas, parcialmente o hasta homogeneidad, según se desee, si son para uso terapéutico, los polipéptidos deberían estar sustancialmente exentos de endotoxinas.

Los métodos para la expresión de anticuerpos de cadena simple y/o para el plegamiento hasta una forma activa adecuada, que incluye los anticuerpos de cadena simple, de bacterias tales como *E. coli*, se han descrito y son muy conocidos y aplicables a los anticuerpos descritos en la presente memoria. Véase, Buchner et al., Anal. Biochem. 205:263-270, 1992; Pluckthun, Biotechnology 9:545, 1991; Huse et al., Science 246:1275, 1989 y Ward et al., Nature 341:544, 1989.

A menudo, las proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias se aíslan de cuerpos de inclusión, y requieren la solubilización mediante el uso de agentes desnaturizantes fuertes, y el plegamiento posterior.

- 5 Durante la etapa de solubilización, como se conoce bien en la técnica, debe haber presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón ejemplar con un agente reductor es: Tris 0,1 M de pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0,3 M (ditioeritritol). La reoxidación de los enlaces disulfuro se puede dar en presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describió en Saxena et al., *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970, y en especial como describió Buchner et al., anteriormente mencionado.
- La renaturalización se lleva a cabo en general mediante dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida en tampón de replegamiento. Un tampón ejemplar es Tris 0,1 M, pH 8,0, L-arginina 0,5 M, glutatión oxidado 8 mM (GSSG), y EDTA 2 mM.
- 10 Como modificación para el protocolo de purificación de anticuerpos de dos cadenas, las regiones de la cadena pesada y ligera se solubilizan por separado y se reducen, y después se combinan en la disolución de replegamiento. Se obtiene un rendimiento ejemplar cuando estas dos proteínas se mezclan en una proporción molar de forma que no se supera un exceso molar de 5 veces de una proteína respecto de la otra. Se puede añadir glutatión oxidado en exceso u otros compuestos oxidantes de peso molecular bajo a la disolución de replegamiento después de completar la reordenación redox.
- 15 Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos, anticuerpos marcados y fragmentos funcionales de los mismos que se describen en la presente memoria también se pueden construir completamente o parcialmente mediante el uso de la síntesis de péptidos estándar. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos de menos de alrededor de 50 aminoácidos de longitud se puede llevar a cabo uniendo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes de la secuencia. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Merrifield, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Parte A, págs. 3-284; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2156, 1963, y Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984. Las proteínas de longitud mayor se pueden sintetizar mediante la condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos.
- 20 Los métodos para la formación de enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxiterminal (tal como mediante el uso del reactivo de acoplamiento N,N'-diciohexilcarbodiimida) son muy conocidos en la técnica.
- En una realización, los anticuerpos, ácidos nucleicos, vectores de expresión, células hospedadoras u otros productos biológicos están aislados. "Aislado" significa que el producto se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos del medio (tal como una célula) en el que se da de manera natural el componente, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y anticuerpos que se han "aislado" incluyen ácidos nucleicos y anticuerpos purificados mediante métodos de purificación habituales. El término también abarca los ácidos nucleicos y anticuerpos preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como los ácidos nucleicos sintetizados químicamente.
- 30 Inmunoconjugados que comprenden anticuerpos anti-HMW-MAA
- 35 Los anticuerpos, o los fragmentos funcionales de los mismos, que se unen de manera específica a HMW-MAA se pueden usar en métodos terapéuticos. En varias realizaciones, los anticuerpos o los fragmentos funcionales de los mismos descritos en la presente memoria se pueden conjugar con un agente terapéutico. Los inmunoconjugados incluyen, pero sin limitación, las moléculas en las que hay una unión covalente de un agente terapéutico a un anticuerpo. Un agente terapéutico es un agente con una actividad biológica particular dirigida hacia una molécula objetivo particular o una célula que alberga una molécula objetivo. Un experto en la técnica apreciará que los agentes terapéuticos pueden incluir diversos fármacos, tales como vinblastina, daunomicina y similares, citotoxinas tales como exotoxina de *Pseudomonas* nativa o modificada o toxina de la Difteria, agentes de encapsulación (tales como liposomas) que contienen ellos mismos composiciones farmacológicas, agentes radiactivos tales como ¹²⁵I, ³²P, ¹⁴C, ³H y ³⁵S y otros marcadores, restos selectivos y ligandos.
- 40 La elección de un agente terapéutico particular depende de la molécula o célula objetivo particular, y del efecto biológico deseado. Así, por ejemplo, el agente terapéutico puede ser una citotoxina que se usa para provocar la muerte de una célula objetivo particular. A la inversa, cuando se desea provocar una respuesta biológica no letal, el agente terapéutico se puede conjugar con un agente farmacológico no letal o un liposoma que contiene un agente farmacológico no letal.
- 45 Con los agentes terapéuticos y anticuerpos descritos en la presente memoria, un experto puede construir fácilmente una diversidad de clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que codifican la misma secuencia de M.E. o anticuerpo. Así, la presente descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados y proteínas de fusión de los mismos.
- 50 Las moléculas efectoras se pueden unir a un anticuerpo de interés mediante el uso de cualquier medio conocido para los expertos en la técnica. Se pueden usar medios de unión tanto covalentes como no covalentes. El procedimiento para la unión de una molécula efectora a un anticuerpo varía según la estructura química de la molécula efectora. Los polipéptidos contienen en general una diversidad de grupos funcionales; tales como ácido
- 55

carboxílico (-COOH), amina libre (-NH₂) o grupos sulfhidrilo (-SH), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora. De manera alternativa, el anticuerpo se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas ligadoras, tales como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. El ligador puede ser cualquier molécula usada para unir el anticuerpo a la molécula efectora. El ligador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora. Los ligadores adecuados son muy conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen, pero sin limitación, ligadores de carbono de cadena lineal o ramificada, ligadores de carbono heterocíclicos, o ligadores peptídicos. Cuando el anticuerpo y la molécula efectora son polipéptidos, los ligadores se pueden unir a los aminoácidos constituyentes por medio de sus grupos laterales (tal como por medio de una unión disulfuro en las cisteínas) o en los grupos amino y carboxilo en el carbono alfa de los aminoácidos terminales.

En ciertas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su sitio objetivo. Por lo tanto, en estas circunstancias, los inmunoconjugados comprenderán uniones que son escindibles en las inmediaciones del sitio objetivo. La escisión del ligador para liberar la molécula efectora del anticuerpo se puede provocar mediante la actividad enzimática o las condiciones a las que se somete al inmunoconjugado dentro de la célula objetivo o en las inmediaciones del sitio objetivo.

En vista del gran número de métodos que se han informado para unir una diversidad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterapéuticos, fármacos marcadores (tales como enzimas o moléculas fluorescentes), toxinas, y otros agentes a los anticuerpos, un experto en la técnica será capaz de determinar un método adecuado para unir un agente concreto a un anticuerpo u otro polipéptido.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen de manera específica a HMW-MAA descritos en la presente memoria se pueden derivatizar o unir a otra molécula (tal como otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o una porción de los mismos se derivatiza de forma que la unión a HMW-MAA no se vea afectada de manera adversa por la derivatización o marcaje. Por ejemplo, el anticuerpo se puede unir funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a otra u otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o porción del anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce mediante el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes, tal como para crear anticuerpos biespecíficos). Los entrecruzadores adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos diferentes separados mediante un espaciador adecuado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (tal como suberato de disuccinimidilo). Tales entrecruzadores están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.

Un anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA o un fragmento funcional del mismo se puede marcar con un resto detectable. Los agentes de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes, que incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamin-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina, compuestos fosforescentes de lantánidos y similares. Los marcadores bioluminiscentes también son útiles, tales como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP). Un anticuerpo también se puede marcar con enzimas que son útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares.

Cuando un anticuerpo se marca con una enzima detectable, se puede detectar añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que se puede detectar. Por ejemplo, cuando el agente peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable visualmente. Un anticuerpo también se puede marcar con biotina, y detectarlo por medio de la medida indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Se debería indicar que la propia avidina se puede marcar con una enzima o un marcador fluorescente.

Un anticuerpo se puede marcar con un agente magnético, tal como gadolinio. Los anticuerpos también se pueden marcar con lantánidos (tales como europio y disprosio), y manganeso. Las partículas paramagnéticas, tales como el óxido de hierro superparamagnético, también son útiles como marcadores. Un anticuerpo se puede marcar también con epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión de metales, etiquetas de epítomos). En ciertas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Un anticuerpo se puede marcar también con un radiomarcador, p.ej. un aminoácido radiomarcado. El radiomarcador se puede usar para fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador se puede usar para detectar HMW-MAA mediante rayos x, espectros de emisión, formación de imágenes de resonancia magnética (MRI), barrido mediante tomografía computerizada (CT), tomografía de emisión de positrones (PET), u otras técnicas de diagnóstico. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los radioisótopos o

radionúclidos siguientes: ^{35}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{19}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{131}I , ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , y ^{125}I .

Los anticuerpos marcados se pueden usar en una diversidad de inmunoensayos, que incluyen la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica, radioinmunoensayos (RIAs), y ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Los medios para detectar tales marcadores son muy conocidos para los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, los radiomarcadores se pueden detectar mediante el uso de una película fotográfica o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes se pueden detectar mediante el uso de un fotodetector para detectar la iluminación emitida.

Un anticuerpo también se puede derivatizar con un grupo químico, tal como polietilén glicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo de carbohidrato. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, tal como para incrementar la semivida en suero o para incrementar la unión al tejido.

Se pueden emplear toxinas con los anticuerpos específicos hacia HMW-MAA, y los fragmentos funcionales de los mismos, que se describen en la presente memoria, para producir inmunotoxinas. Las toxinas ejemplares incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria y las subunidades de las mismas, así como las toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas están fácilmente disponibles de fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo.). Las toxinas contempladas también incluyen las variantes de las toxinas descritas en la presente memoria (véanse, por ejemplo, las pat. de EE.UU. n.ºs 5.079.163 y 4.689.401). En una realización, la toxina es la exotoxina de *Pseudomonas* (EP) (pat. de EE.UU. n.º 5.602.095). Tal como se usa en la presente memoria, "exotoxina de *Pseudomonas*" se refiere a una EP nativa de longitud completa (que se da de manera natural) o una EP que se ha modificado. Tales modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, la eliminación del dominio la, deleciones de diversos aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos individuales y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxiloterminial (por ejemplo, véase Siegall et al., *J. Biol. Chem.* 264:14256-14261, 1989). En una realización, el fragmento citotóxico de EP conserva al menos un 50%, al menos un 75%, al menos un 90%, o al menos un 95% de la citotoxicidad de la EP nativa. En ciertos ejemplos, el fragmento citotóxico es más tóxico que la EP nativa.

La exotoxina de *Pseudomonas* (EP) A nativa es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular de 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en las células eucarióticas. El método de acción de EP es la inactivación de la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2). La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan coordinadamente para provocar la citotoxicidad. El dominio la media en la unión celular. El dominio II es responsable de la translocación al citosol, y el dominio III media en la ADP-ribosilación del factor de elongación 2. La función del dominio Ib es desconocida. La EP empleada con los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria puede incluir la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa, y variantes modificadas de manera conservativa de la EP nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de EP incluyen los que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico posterior o de otro tipo en la célula objetivo. Los fragmentos citotóxicos de EP incluyen PE40, PE38, y PE35. Para una descripción adicional de EP y de las variantes de la misma, véanse, por ejemplo, las pat. de EE.UU. n.ºs 4.892.827; 5.512.658; 5.602.095; 5.608.039; 5.821.238; y 5.854.044; el documento WO 99/51643; Pai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3358-3362, 1991; Kondo et al., *J. Biol. Chem.* 263:9470-9475, 1988; Pastan et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1333:C1-C6, 1997.

Los anticuerpos y los fragmentos funcionales de los mismos descritos en la presente memoria se pueden usar también para transportar selectivamente cualquier número de diferentes compuestos diagnósticos o terapéuticos a las células que expresan HMW-MAA en su superficie. Así, un anticuerpo de la presente descripción se puede unir directamente o por medio de un ligador a un fármaco que se va a administrar directamente a las células que expresan HMW-MAA en la superficie celular. Los agentes terapéuticos incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos, o virus recombinantes. Los restos de ácido nucleico terapéuticos y diagnósticos incluyen ácidos nucleicos inversos, oligonucleótidos derivatizados para el entrecruzamiento covalente con ADN simple o doble, y oligonucleótidos que forman moléculas triples.

De manera alternativa, la molécula unida a un anticuerpo anti-HMW-MAA puede ser un sistema de encapsulación, tal como un liposoma o micela que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico inverso), u otro resto terapéutico que preferiblemente se protege de la exposición directa al sistema circulatorio. Los medios para preparar liposomas unidos a anticuerpos son muy conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la pat. de EE.UU. n.º 4.957.735; Connor et al., *Pharm. Ther.* 28:341-365, 1985).

Composiciones y Métodos Terapéuticos

En la presente memoria se proporcionan composiciones que incluyen un vehículo y uno o más anticuerpos que se unen de manera específica a HMW-MAA, o fragmentos funcionales de los mismos que se unen de manera específica a HMW-MAA. Las composiciones se pueden preparar en formas farmacéuticas unitarias para la administración a un sujeto. La cantidad y el momento de la administración dependen del criterio del médico que aplica el tratamiento para alcanzar los fines deseados. El anticuerpo se puede formular para la administración

sistémica o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, el anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA se formula para la administración parenteral, tal como administración intravenosa.

Las composiciones para administración pueden incluir una disolución del anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA (o un fragmento funcional del mismo) disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Se puede usar una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas disoluciones son estériles y en general están exentas de materias indeseables. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y agentes tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico y similares. La concentración del anticuerpo en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, la viscosidad, el peso corporal, y similares, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del sujeto.

Una dosis típica de la composición farmacéutica para administración intravenosa incluye alrededor de 0,1 a 15 mg de anticuerpo por kg peso corporal del sujeto al día. Se pueden usar dosis de 0,1 a alrededor de 100 mg por kg al día, en particular si el agente se administra en un sitio aislado y no en el sistema circulatorio o linfático, tal como en una cavidad corporal o en la luz de un órgano. Los métodos concretos para la preparación de composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica, y se describen con más detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1995).

Los anticuerpos se pueden proporcionar en forma liofilizada y rehidratarlos con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. La solución de anticuerpo se añade después a una bolsa de infusión que contiene un 0,9% de cloruro sódico, USP, y en general se administran a una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Hay disponible una experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpos, que se han comercializado en los EE.UU. desde la aprobación de RITUXAN (marca registrada) en 1997. Los anticuerpos se pueden administrar mediante infusión lenta, en vez de en una inyección rápida intravenosa. En un ejemplo, se administra una dosis de carga mayor, con dosis de mantenimiento posteriores que se administran a un nivel inferior. Por ejemplo, se puede infundir una dosis de carga inicial de 4 mg/kg a lo largo de un periodo de unos 90 minutos, seguido de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidos a lo largo de un periodo de 30 minutos si la dosis previa se toleró bien.

El anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA (o un fragmento funcional del mismo) se puede administrar para ralentizar o inhibir el crecimiento de células, tales como células cancerosas. En estas aplicaciones, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo a un sujeto en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento, la replicación o la metástasis de las células cancerosas, o para inhibir un signo o síntoma del cáncer. En ciertas realizaciones, los anticuerpos se administran a un sujeto para inhibir o prevenir el desarrollo de metástasis, o para disminuir el tamaño o número de metástasis, tal como micrometástasis, por ejemplo micrometástasis en los nódulos linfáticos regionales (Goto et al., Clin. Cancer Res. 14(11): 3401-3407, 2008).

Los sujetos adecuados pueden incluir los diagnosticados con un cáncer que expresa HMW-MAA, tal como, pero sin limitación, melanoma, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas (tal como carcinoma de célula escamosas de cabeza y cuello), cáncer de mama (que incluye, pero sin limitación, carcinoma de mama basal, carcinoma ductal y carcinoma de mama lobulillar), leucemia (tal como leucemia mielógena aguda y leucemia aguda positiva para 11g23), un tumor de la cresta neural (tal como un astrocitoma, glioma o neuroblastoma), cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer pancreático, cáncer de hueso (tal como un cordoma), glioma o un sarcoma (tal como condrosarcoma). Preferiblemente, el anticuerpo se administra para tratar un tumor sólido. Más preferiblemente, el anticuerpo se administra a un sujeto que padece cáncer de piel, p.ej. melanoma maligno.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de HMW-MAA dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo es aquella que proporciona el alivio subjetivo de un/varios síntoma(s), o una mejora identificable objetivamente, tal como la observa el médico u otro observador cualificado. Estas composiciones se pueden administrar junto con otro agente quimioterápico, de manera simultánea o secuencial.

En la actualidad se conocen muchos agentes quimioterápicos en la técnica. En una realización, los agentes quimioterápicos se seleccionan del grupo que consiste en inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores de factores de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de topoisomerasas, agentes anti-supervivencia, modificadores de la respuesta biológica, anti-hormonas, p.ej. anti-andrógenos, y agentes anti-angiogénesis.

Los agentes anti-angiogénesis, tales como los inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de la matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de la matriz 9), e inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II), se pueden usar junto con un compuesto de la invención. Los ejemplos de inhibidores de COX-II útiles incluyen CELEBREX (Marca Registrada) (alecoxib), valdecoxib, y rofecoxib. Los ejemplos de inhibidores de metaloproteinasa de la matriz útiles se describen

en los documentos WO 96/33172, WO 96/27583, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, EP606.046, EP931.788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, U.S. 5.863.949, U.S. 5.861.510 y EP780.386.

5 En un ejemplo, los inhibidores de MMP no inducen artralgia tras la administración. En otro ejemplo, el inhibidor de MMP inhibe selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 respecto de las otras metaloproteinasas de la matriz (tales como MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, y MMP-13). Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP útiles son AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, ácido 3[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxabicyclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido (2R,3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidropiran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]-propiónico; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico; hidroxiamida de ácido (R) 3-[[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidro-piran-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido (2R,3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-1-metil-etil)-amino]-propiónico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahidropiran-4-il)-amino]-propiónico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxabicyclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxabicyclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; e hidroxiamida de ácido (R) 3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidro-furano-3-carboxílico; y las sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Los anticuerpos que se unen de manera específica a HMW-MAA también se pueden usar con inhibidores de la transducción de señales, tales como los agentes que pueden inhibir las respuestas del EGF-R (receptor de factor de crecimiento epidérmico), tales como anticuerpos hacia EGF-R, anticuerpos hacia EGF, y moléculas que son inhibidores de EGF-R; inhibidores de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tales como receptores de VEGF y moléculas que pueden inhibir VEGF; e inhibidores del receptor de erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se unen al receptor de erbB2, por ejemplo, HERCEPTIN (Marca Registrada) (Genentech, Inc.). Los inhibidores de EGF-R se describen, por ejemplo, en los documentos WO 95/19970, WO 98/14451, WO 98/02434, y U.S. 5.747.498. Los agentes que inhiben EGFR también incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos monoclonales C225 y anti-EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. y Merck KgaA), y los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD-1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Farmacia/Sugen), CI-1033 (Warner Lambert Parke Davis), CI-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL-387,785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidina A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Farmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), la toxina de fusión de EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Ligand), ZM-252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WH1 -- P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) y la vacuna de EGF-R (York Medical/Centro de Inmunología Molecular (CIM)).

También se pueden usar inhibidores de VEGF, por ejemplo SU-5416 y SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering), y NX-1838 (NeXstar) junto con un anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA. Los inhibidores de VEGF se describen, por ejemplo, en los documentos WO 99/24440, WO 95/21613, WO 99/61422, U.S. 5.834.504, WO 98/50356, U.S. 5.883.113, U.S. 5.886.020, U.S. 5.792.783, WO 99/10349, WO 97/32856, WO 97/22596, WO 98/54093, WO 98/02438, WO 99/16755 y WO 98/02437. Otros ejemplos de algunos inhibidores de VEGF específicos son IM862 (Cytran Inc.); el anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc.; y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme y Chiron. Se pueden usar estos y otros inhibidores de VEGF junto con un anticuerpo que se une de manera específica a HMW-MAA.

Los inhibidores del receptor ErbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome plc), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y 2B-1 (Chiron), se pueden combinar además con el compuesto de la descripción, por ejemplo los indicados en los documentos WO 98/02434, WO 99/35146, WO 99/35132, WO 98/02437, WO 97/13760, WO 95/19970, U.S. 5.587.458 y U.S. 5.877.305.

Para el tratamiento del cáncer, tal como melanoma, los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden usar con un tratamiento quirúrgico, o con otro tratamiento terapéutico que incluye dacarbazina (también denominada DTIC), o interleucina-2 (IL-2) o interferón, tal como interferón- α 2b (IFN- α 2b), o bisfosfonatos, tales como zoledronato. Para el tratamiento de un melanoma superficial, se pueden usar los anticuerpos junto con Imiquimod. Para tratamiento del cáncer de próstata, se pueden usar los anticuerpos junto con, por ejemplo, cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia hormonal (tal como anti-andrógenos o antagonistas de GnRH). Para el tratamiento de HNSCC, los anticuerpos proporcionados en la presente memoria se pueden usar junto con cirugía, radioterapia, quimioterapia, otros anticuerpos (tales como cetuximab y bevacizumab) o agentes terapéuticos de moléculas pequeñas (tales como erlotinib).

60 Se proporcionan administraciones simples o múltiples de las composiciones dependiendo de la dosis y la frecuencia, según sean requeridas y toleradas por el paciente. En cualquier caso, la composición debería proporcionar una

cantidad suficiente de al menos uno de los anticuerpos (o fragmentos funcionales de los mismos) descritos en la presente memoria para tratar de manera eficaz al paciente. La dosis se puede administrar una vez, pero se puede aplicar de manera periódica hasta alcanzar un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios justifiquen el abandono de la terapia. En un ejemplo, se infunde una dosis del anticuerpo durante treinta minutos cada dos días. En este ejemplo, se puede administrar de alrededor de una a alrededor de diez dosis, tal como tres o seis dosis cada dos días. En un ejemplo adicional, se administra una infusión continua durante alrededor de cinco a alrededor de diez días. El sujeto se puede tratar a intervalos regulares, tal como mensualmente, hasta alcanzar un resultado terapéutico deseado. En general, la dosis es suficiente para tratar o mejorar los síntomas o signos de la enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable al paciente.

Las formulaciones parenterales de liberación controlada se pueden hacer en forma de implantes, inyecciones oleosas, o en forma de sistemas particulados. Para un resumen amplio de los sistemas de administración de proteínas, véase, Banga, A. J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, Pa., (1995). Los sistemas particulados incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, en forma de un núcleo central. En las microesferas, el agente terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas, y microcápsulas menores de alrededor de 1 μm se denominan en general nanopartículas, nanoesferas, y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 μm , de forma que solamente las nanopartículas se administran de manera intravenosa. Las micropartículas tienen en general alrededor de 100 μm de diámetro, y se administran de manera subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., págs. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, N.Y., págs. 315-339, (1992).

Se pueden usar polímeros para la liberación controlada por iones de las composiciones de anticuerpos descritas en la presente memoria. En la técnica se conocen diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para el uso en la administración controlada de fármacos (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26:537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero en bloque, polaxámero 407, existe en forma de un líquido viscoso, aunque móvil, a temperaturas bajas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y administración sostenida de interleucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., *Farm. Res.* 9:425-434, 1992; y Pec et al., *J. Parent. Sci. Tech.* 44(2):58-65, 1990). De manera alternativa, se ha usado hidroxipatito como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm.* 112:215-224, 1994). En otro aspecto, se usan liposomas para la liberación controlada, así como para el transporte selectivo del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa. (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas (véanse los documentos U.S. 5.055.303; U.S. 5.188.837; U.S. 4.235.871; U.S. 4.501.728; U.S. 4.837.028; U.S. 4.957.735; U.S. 5.019.369; U.S. 5.055.303; U.S. 5.514.670; U.S. 5.413.797; U.S. 5.268.164; U.S. 5.004.697; U.S. 4.902.505; U.S. 5.506.206; U.S. 5.271.961; U.S. 5.254.342 y U.S. 5.534.496).

Eficacia terapéutica relativa de los anticuerpos de IgE e IgG hacia un antígeno asociado a melanoma

Los anticuerpos terapéuticos complementan ahora los tratamientos convencionales de ciertas enfermedades malignas, y han mejorado el pronóstico para muchos pacientes de cáncer. Más de la mitad de los anticuerpos se aprueban para el tratamiento de neoplasias malignas sanguíneas, pero se necesitan urgentemente tratamientos con anticuerpos de tumores sólidos, no hematopoyéticos.

IgG es la única clase de anticuerpo examinada en la inmunoterapia del cáncer. La escasa penetración en los tejidos de los anticuerpos de IgG y la baja afinidad de las IgGs hacia sus receptores en las células inmunitarias pueden explicar parcialmente las débiles respuestas inmunitarias observadas y la escasa actividad resultante de muchos anticuerpos de IgG contra tumores sólidos.

Los anticuerpos de clase IgE desempeñan un papel importante en la respuesta alérgica humana, pero también son contribuyentes clave a la defensa del cuerpo contra las infecciones parasitarias. Los anticuerpos de IgE residen de manera natural en los tejidos. Se pueden transportar desde la circulación a los tejidos, en los que, por medio de su intensa afinidad hacia sus receptores en las células inmunitarias, se sabe que desencadenan potentes respuestas inmunitarias.

En las realizaciones de la presente invención, el anticuerpo se dirige contra el antígeno de melanoma de la superficie celular HMW-MAA (antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado), que se sobreexpresa en > 80% de los melanomas, como objetivo para la inmunoterapia con anticuerpos. Como se demuestra en el Ejemplo más adelante, dos anticuerpos monoclonales quiméricos (un IgG y un IgE) de la misma especificidad contra HMW-MAA (cada uno comprende las mismas secuencias de la región variable de un anticuerpo de ratón) tuvieron efectos diferenciales *in vivo*. Debido a la destrucción diferencial de tumores de melanoma mediada por células efectoras inmunitarias mediante cada anticuerpo, el anticuerpo de IgE tuvo una eficacia superior en un modelo de xenoinjerto *in vivo* de melanoma.

En la presente memoria se ha demostrado sorprendentemente que la modificación de anticuerpos con regiones Fc

de una clase de anticuerpo diferente puede mejorar las funciones efectoras del anticuerpo, si los anticuerpos de esta clase pueden ejercer una vigilancia inmunitaria natural en las localizaciones anatómicas en las que se pueden hallar los tumores. Este concepto puede ser especialmente relevante en el caso de los tumores sólidos, ya que con frecuencia estos son resistentes al tratamiento con los anticuerpos de IgG. Con una semivida en suero de 21-24 días, en comparación con una semivida de 2-3 días en los tejidos, los anticuerpos de IgG pueden ser la clase de anticuerpos más eficaz para seleccionar como objetivo los tumores que residen en la sangre y las células tumorales circulantes, aunque su capacidad de ejercer la vigilancia de tumores en los tejidos puede ser menos potente [18, 19]. Otros parámetros que pueden modular las funciones anti-tumorales de las IgG podrían ser una incorporación lenta o ineficaz y/o una inhibición local de las células efectoras inmunitarias activadoras por las células tumorales en las lesiones, y la presencia/inducción de células inmunorreguladoras por los tumores *in situ* [20]. Para los anticuerpos de la clase IgG que sí se localizan en las lesiones tumorales, superar estos medios inmunomoduladores puede ser un desafío. Además, factores tales como la baja afinidad de las IgG hacia sus receptores Fcγ y la presencia del receptor inhibitorio FcγRIIb en las células inmunitarias que infiltran los tumores, tales como los macrófagos, pueden influir negativamente en la eficacia de los anticuerpos de IgG en los tejidos [21, 22].

Debido a que cada clase de anticuerpo funciona en diferentes compartimentos anatómicos, y funciona a través de receptores de Fc y células efectoras inmunitarias exclusivas, los presentes inventores se han centrado en los anticuerpos de la clase IgE, habitualmente conocida por su papel en la respuesta alérgica y la protección contra parásitos. Los anticuerpos de esta clase funcionan a través de sus receptores específicos de Fc de afinidad elevada en un espectro diferente de células efectoras respecto de IgG, y residen de manera natural en los tejidos en los que ejercen la vigilancia inmunológica. Los resultados mostrados en la presente memoria demuestran que estas propiedades se pueden traducir en una eficacia superior en la selección como objetivo de tumores que residen en los tejidos, tales como el melanoma.

Ventajas de IgE como terapia de anticuerpos para el tratamiento de tumores sólidos

Residencia en los tejidos:

La concentración de IgE en el suero de los individuos normales es mínima (<150 ng/ml, es decir, 1/10.000 la concentración de IgG), y, a diferencia de IgG, la presencia de IgE en la sangre es de corta duración (semivida de 1,5 días) [23, 24, 19]. Sin embargo, la IgE se transfiere a los tejidos y se retiene localmente mediante células residentes que expresan receptores de IgE potentes tales como mastocitos, macrófagos y células dendríticas con una semivida medida de dos semanas, proporcionalmente más larga que la de IgG (2-3 días) [24, 18].

Afinidad elevada por los receptores de IgE:

La afinidad de IgE por su receptor de afinidad elevada, FcεR1, ($K_a=10^{11} \text{ M}^{-1}$) es 10^2 - 10^5 veces mayor que la de las IgGs por sus receptores, lo que le hace el único anticuerpo claramente retenido por las células efectoras en ausencia de antígeno [23, 25, 19]. La disociación lenta del complejo IgE-FcεR1 y la retención local de IgE en los tejidos se puede traducir en dosis terapéuticas eficaces inferiores y/o una frecuencia reducida de administración en comparación con IgG.

Carencia de receptor inhibitorio:

A diferencia de IgG, IgE no está sujeta a ningún receptor inhibitorio (*cf.* FcγRIIb), con la implicación potencial de que las propiedades supresoras de los micromedios del tumor pueden no resistir tan intensamente las funciones efectoras de IgE específicas del tumor contra los tumores residentes en los tejidos.

Células efectoras inmunitarias residentes en los tejidos en tumores:

Una gran proporción, tan alta como un 50%, de las lesiones tumorales están constituidas por células inmunitarias infiltrantes que se concentran también alrededor de los tumores [26]. Algunos de estos infiltrados son células efectoras que expresan FcεR potentes conocidas, tales como monocitos/macrófagos, mastocitos, células dendríticas y eosinófilos. En ausencia de IgE específica de antígeno tumoral, estas células pueden carecer de la actividad necesaria para seleccionar como objetivo las células tumorales debido a las señales inmunosupresoras en el micromedio tumoral [27, 28].

Funciones efectoras potentes:

La IgE es extremadamente potente en la incorporación y activación de células efectoras (células T, monocitos, eosinófilos, basófilos) en el sitio de exposición al antígeno, por medio de la liberación de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, GM-CSF y TNF-α), y también en la activación de estas células *in situ*. Los mediadores liberados por los mastocitos (histamina, leucotrienos y proteasas) estimulan la incorporación y activación adicional de células efectoras sanguíneas [29]. En el contexto de su papel protector en las infecciones parasitarias, se sabe que los anticuerpos de IgE desencadenan tanto la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC), como la fagocitosis celular mediada por anticuerpos de los parásitos [30-34]. Ambos receptores de IgE se activan por IgE e IL-4 en las células efectoras *in situ*, y se sabe que participan en estos mecanismos de acción.

Estas propiedades de los anticuerpos de IgE se pueden redirigir a aumentar la citotoxicidad y la fagocitosis de las células tumorales, así como a iniciar la presentación de antígenos dependiente de anticuerpos de IgE por parte de las células presentadoras de antígenos que albergan receptores de IgE tales como las células dendríticas, células B y macrófagos. Así, la inmunidad pasiva y activa contra los tumores sólidos podría actuar en conjunto en tejidos tales como la piel, poblada de manera natural por células efectoras de IgE. La intensidad de las respuestas inmunitarias mediadas por IgE en los tejidos, entonces, conlleva la expectativa de una potencia, así como una longevidad, incrementadas de la vigilancia inmunitaria mediante IgE y las células efectoras contra los tumores de piel.

HMW-MAA es un objetivo adecuado para la inmunoterapia con anticuerpos

Se ha identificado el antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA) como objetivo adecuado para la inmunoterapia con anticuerpos. El proteoglicano de sulfato de condroitina de la superficie celular HMW-MAA se expresa en > 80% de las lesiones de melanoma, pero no en los melanocitos normales. Su distribución restringida en los tejidos normales está bien documentada (células basales de la epidermis, progenitores epidérmicos y del folículo piloso, condrocitos). La expresión en las lesiones primarias y metastásicas y la heterogeneidad limitada entre tumores lo convierten potencialmente en un objetivo terapéutico sumamente adecuado [35]. Su presencia en los pericitos activados de la vasculatura angiogénica asociada a tumores sugiere un papel en la regulación y estimulación de la angiogénesis tumoral [36]. Esto podría ofrecer una ventaja adicional para la terapia con anticuerpos, no solamente para seleccionar como objetivo las células tumorales que expresan HMW-MAA, sino también para restringir la angiogénesis y reducir el crecimiento y la migración de las células tumorales. HMW-MAA aumenta la motilidad, la migración y la capacidad metastásica de las células de melanoma aumentando las interacciones con la matriz extracelular. También puede actuar como factor de crecimiento auxiliar, y tiene un papel en la proliferación de las células de melanoma. Esto da esperanzas sobre la eliminación preferente de las células de melanoma que expresan HMW-MAA más agresivas - es decir, más proliferativas y metastásicas - mediante anticuerpos específicos. Los estudios preclínicos y clínicos han estudiado la eficacia de la inmunoterapia dirigida a HMW-MAA del melanoma. Sin embargo, se ha propuesto que los anticuerpos de ratón hacia HMW-MAA no funcionan mediante mecanismos inmunológicos *in vitro* y en modelos animales [37], y por tanto no se han descrito intentos de modificar derivados que puedan desencadenar las funciones de las células efectoras que expresan Fc humano (es decir, la clonación con regiones Fc humanas).

mAb 225.28s: un anticuerpo monoclonal contra HMW-MAA

En una realización, el anticuerpo comprende una región de unión al antígeno derivada de mAb 225.28s. El anticuerpo monoclonal 225.28s se dirige contra HMW-MAA, y se desarrolló en el laboratorio del Prof. Soldano Ferrone (actualmente en la Universidad de Pittsburg, EE.UU.). Las secuencias de la región variable las publicó en 1996 Neri et al, y el clon de ratón original se hizo en un formato de hibridoma [38]. Se ha establecido que el anticuerpo se une con una afinidad elevada y especificidad elevada a un epítipo de la proteína objetivo, y que es univalente - un requisito de seguridad en el contexto de una IgE terapéutica, como se explicó anteriormente. La eficacia de este clon se ensayó en varios modelos *in vitro* e *in vivo* [39, 40].

Los primeros estudios *in vitro* indican que el clon de anticuerpo 225.28s de ratón provoca, aunque solamente débilmente, una toxicidad hacia las células de melanoma mediada tanto por el complemento como por células. Las pruebas sugieren, de hecho, que los mecanismos principales mediante los que funcionan los anticuerpos, tales como 225.28s, desarrollados contra HMW-MAA no son inmunológicos, ya que están asociados a una proliferación y neovascularización reducidas, y la restricción de la migración y metástasis de las células. Estos mecanismos se han informado recientemente en el contexto de las células de cáncer de mama triple negativo que expresan el antígeno. Los estudios adicionales han demostrado la capacidad del anticuerpo de IgG 225.28s de ratón de inhibir el crecimiento tumoral del melanoma en un xenoinjerto humano cultivado s.c. en ratones SCID. Aunque los mecanismos de su función no se analizaron completamente, los autores admitieron que el acceso restringido de estos anticuerpos (de clase IgG) a los tejidos sólidos fue una explicación probable al grado moderado de regresiones tumorales observadas. En un modelo diferente, la IgG de ratón acoplada a metotrexato fue activa en la selección e inhibición del crecimiento de un xenoinjerto de melanoma humano, cultivado s.c. en ratones atímicos. Un derivado de 225.28s conjugado con toxina ha alcanzado la fase de ensayo clínico, y se han diseñado derivados de scFv [41, 42].

Sin embargo, hasta la fecha, no se ha modificado una molécula de esta especificidad hasta una forma recombinante quimérica o humanizada. El clon de anticuerpo de ratón adolece de dos desventajas evidentes: a) se espera que las secuencias de ratón induzcan respuestas HAMA (anticuerpo humano anti-murino) en los pacientes, lo que da como resultado la neutralización del anticuerpo y el aclaramiento rápido de la circulación, y de ese modo se reduce significativamente la eficacia contra las células tumorales, y b) no se espera que un anticuerpo con regiones Fc de ratón incorpore de manera eficaz células efectoras inmunitarias humanas que expresan FcR que pueden seleccionar como objetivo y destruir células tumorales mediante mecanismos tales como citotoxicidad y/o fagocitosis. Por lo tanto, no se ha propuesto previamente la relevancia terapéutica potencial de un agente recombinante con esta especificidad. Por lo tanto, como se describe en el Ejemplo siguiente, se llevó a cabo una comparación directa, basada en anticuerpos 225.28s quiméricos de clases diferentes, IgG1 e IgE, y se examinó su eficacia potencial en el tratamiento del melanoma.

La invención se describirá adicionalmente a continuación con referencia al siguiente ejemplo no limitante.

Ejemplo

Modificación de anticuerpos específicos del antígeno de melanoma

Modificación y caracterización de anticuerpos quiméricos de IgE e IgG1 que reconocen el antígeno HMW-MAA

5 El sistema para la clonación de expresión usado en el presente estudio permite la producción de anticuerpos de cualquier clase en unas cuantas semanas (véase la Figura 1). Se optimizaron los codones de las secuencias de nucleótidos que codificaban las regiones variables de la cadena pesada y ligera del clon del anticuerpo murino 225.28s (véanse las Figuras 12 a 15, SEQ ID N°s: 3 a 6) para la expresión en seres humanos. Las secuencias optimizadas para los codones humanos (mostradas en las Figuras 20 y 21, SEQ ID N°s: 11 y 12) se insertaron en los vectores de la cadena pesada y ligera κ de IgG₁ e IgE humanas (que comprenden las regiones constantes de la cadena pesada y ligera κ de IgG₁ e IgE humanas). La secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena pesada de IgE se muestra en la Figura 22 (SEQ ID N°s: 13 a 16), y la secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera κ se muestra en la Figura 23 (SEQ ID N°: 17). Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la cadena pesada y ligera del anticuerpo de IgE quimérico resultante se muestran en las Figuras 16 a 19 (SEQ ID N°s: 7 a 10). Los vectores que comprenden las secuencias quiméricas se usaron para transfectar células HEK297 con eficacias de producción de hasta 15-20 mg por litro de sobrenadante.

Los anticuerpos se purificaron mediante métodos rutinarios previamente publicados [43-47]. Las propiedades biofísicas de los anticuerpos quiméricos modificados se ensayan de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y mediante análisis de cromatografía de exclusión por tamaño en HPLC, y se comparan con los anticuerpos de IgG₁ e IgE MOv18 previamente ensayados generados contra FR α , y también con Trastuzumab de grado clínico (Herceptin®, IgG1) (Figura 2), para determinar la calidad y pureza del producto.

Las interacciones de los anticuerpos anti-HMW-MAA con las células tumorales A375 de melanoma se analizaron mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia. La IgE anti-HMW-MAA reconoció el antígeno HMW-MAA en las células A375 (99,81%), pero no se unió a melanocitos primarios humanos. El anticuerpo de IgE también se unió a monocitos primarios humanos que expresaban Fc ϵ R y células de la línea celular monocítica U937, que también expresaban ambos receptores de IgE, Fc ϵ RI y Fc ϵ RII, con densidades bajas (Figura 3). El anticuerpo de IgG₁ se unió a la superficie de las células de melanoma A375 y a células monocíticas U937 (Figura 3C). La unión específica de los anticuerpos quiméricos de IgE e IgG₁ a la superficie de las células tumorales A375 se confirmó mediante microscopía de inmunofluorescencia, mientras un anticuerpo de IgE de control de isotipo específico de hapteno (IgE NIP) y un anticuerpo de control de IgG₁ humano no mostraron una unión por encima del nivel de fondo (Figura 4). Por lo tanto, se podrían modificar ambos anticuerpos quiméricos de especificidad conocida que reconocieron el objetivo tumoral y las células efectoras inmunitarias esperadas.

Ensayos funcionales in vitro

Se emplearon varios ensayos *in vitro* para examinar la capacidad de los anticuerpos modificados de seleccionar como objetivo y destruir células tumorales, concretamente ensayos de activación de células efectoras mediada por receptores Fc, tales como ensayos de desgranulación funcional y ADCC/ADCP, y ensayos de viabilidad celular (MTT) para estudiar la capacidad de destruir directamente células tumorales por medio del reconocimiento del antígeno. Se observó que:

40 1) En un ensayo de desgranulación funcional que midió el % de liberación de β -hexosaminidasa por células de leucemia basófila de rata RBL SX-38 que expresaban Fc ϵ RI humano, el anticuerpo de IgE hacia HMW-MAA por sí solo no potenció la liberación de β -hexosaminidasa (0,6%). Sin embargo, el anticuerpo indujo una desgranulación significativa de las células RBL SX-38 tras la estimulación con un anticuerpo policlonal anti-IgE humana (Figura 5), lo que demuestra la capacidad de este anticuerpo de activar las células efectoras inmunitarias por medio de la participación de su receptor de afinidad elevada.

45 2) Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* (MTT) demostraron que, a diferencia de trastuzumab (anticuerpos de IgE e IgG1), y como se informó previamente para el anticuerpo de IgG de ratón de la misma especificidad, ni la IgE quimérica anti-HMW-MAA ni el homólogo de IgG1 ejercieron ningún efecto directo sobre la proliferación celular (Figura 5).

50 3) Ambos anticuerpos fueron capaces de activar células efectoras inmunitarias para destruir células cancerosas *in vitro* con una eficacia similar, pero cada uno mediante mecanismos diferentes: la IgG1 quimérica activó monocitos humanos para destruir células tumorales mediante ADCP, mientras la IgE medió en la ADCC de células tumorales (Figura 6).

Estudios de eficacia en un modelo de xenoinjerto de melanoma humano en ratones NOD/SCID γ^{δ} injertados con células efectoras inmunitarias humanas

55 Se llevaron a cabo estudios para analizar la capacidad de los anticuerpos quiméricos específicos del antígeno de

5 melanoma de restringir el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de ratón inmunodeficiente de melanoma humano cultivado de manera subcutánea en ratones NOD/SCID $\gamma^{-/-}$ de origen BALB/c. Las células efectoras inmunitarias humanas administradas en este modelo como PBLs, demuestran de manera reproducible más de un 40% de injerto en el bazo en ratones, lo que hace que este sistema *in vivo* sea equivalente a un fenotipo humanizado. Una exposición a células tumorales de 5×10^5 células de melanoma por ratón dio como resultado un crecimiento tumoral reproducible a lo largo de un periodo de ~4 semanas, y las lesiones fueron positivas para el antígeno HMW-MAA (Figura 7).

10 Mediante el uso de este modelo *in vivo* subcutáneo de melanoma y el injerto de células efectoras inmunitarias humanas en estos ratones, el tratamiento con dosis semanales de IgE (10 mg/kg) dio como resultado un crecimiento tumoral del melanoma drásticamente restringido a lo largo de un periodo de 30 días en comparación con los tratados con la IgG1 quimérica correspondiente a las mismas dosis y en comparación con los que recibieron los controles de anticuerpo inespecífico (n=7, Figura 8). Por lo tanto, a pesar de los niveles similares de eficacias de destrucción de células tumorales *in vitro*, se observó una eficacia mejorada para la IgE anti-HMW-MAA en comparación con la IgG1 correspondiente de la misma especificidad *in vivo*.

15 También se observó una profunda infiltración de células inmunitarias humanas y la presencia de IgE humana en las lesiones tumorales de los ratones que recibieron el anticuerpo de IgE anti-HMW-MAA, pero no se detectó ni infiltración de células inmunitarias humanas ni localización del anticuerpo de IgE en las lesiones de los animales tratados con el anticuerpo de IgE quimérico inespecífico MOv18. Por lo tanto, se concluyó que el tratamiento con el anticuerpo de IgE específico del antígeno de melanoma fue superior en la inducción de la restricción del crecimiento tumoral *in vivo* en comparación con la IgG1 correspondiente. Además, el tratamiento sistémico con la IgE específica del antígeno tumoral estuvo asociado a una intensa localización de IgE e infiltración de células efectoras inmunitarias humanas en las lesiones tumorales de una manera específica del antígeno.

25 En conclusión, los anticuerpos de clases diferentes y especificidades diferentes pueden tener propiedades funcionales diferentes hacia las células cancerosas, activando diferentes familias de receptores de Fc en las células efectoras inmunitarias para destruir los tumores. En el contexto del melanoma, estos estudios indican que un anticuerpo de IgE hacia un antígeno de melanoma tiene una eficacia superior en comparación con la IgG1 correspondiente, lo cual puede estar relacionado con la activación y/o incorporación de células efectoras inmunitarias con Fc ϵ R en un modelo de xenoinjerto en ratón de melanoma.

30 Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas específicas, se debería entender que la invención tal como se reivindica no se debería limitar excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, las diversas modificaciones de los modos descritos de llevar a cabo la invención que son evidentes para los expertos en bioquímica y biotecnología o los campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

Referencias

- 1 Karim-Kos HE, Kiemeny LA, Louwman MW, Coebergh JW, Vries ED (2011) Progress against cancer in the Netherlands since the late 1980s: an epidemiological evaluation. *Int J Cancer*
- 5 2 Culver ME, Gatesman ML, Mancl EE, Lowe DK (2011) Ipilimumab: a novel treatment for metastatic melanoma. *Ann Pharmacother* 45: 510-519
- 3 Kaehler KC, Piel S, Livingstone E, Schilling B, Hauschild A, Schadendorf D (2010) Update on immunologic therapy with anti-CTLA-4 antibodies in melanoma: identification of clinical and biological response patterns, immune-related adverse events, and their management. *Semin Oncol* 37: 485-498
- 10 4 Natarajan N, Telang S, Miller D, Chesney J (2011) Novel immunotherapeutic agents and small molecule antagonists of signalling kinases for the treatment of metastatic melanoma. *Drugs* 71: 1233-1250
- 5 Weiner LM, Surana R, Wang S (2010) Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10: 317-327
- 15 6 Bruggemann M, Williams GT, Bindon CI, Clark MR, Walker MR, Jefferis R, Waldmann H, Neuberger MS (1987) Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies. *J Exp Med* 166: 1351-1361
- 7 Alduaij W, Illidge TM (2011) The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood* 117: 2993-3001
- 8 Dechant M, Valerius T (2001) IgA antibodies for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 39: 69-77
- 20 9 Dechant M, Vidarsson G, Stockmeyer B, Repp R, Glennie MJ, Gramatzki M, van De Winkel JG, Valerius T (2002) Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* 100: 4574-4580
- 10 Dyer MJ, Hale G, Hayhoe FG, Waldmann H (1989) Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood* 73: 1431-1439
- 25 11 Imai M, Landen C, Ohta R, Cheung NK, Tomlinson S (2005) Complement-mediated mechanisms in anti-GD2 monoclonal antibody therapy of murine metastatic cancer. *Cancer Res* 65: 10562-10568
- 12 Lohse S, Derer S, Beyer T, Klausz K, Peipp M, Leusen JH, van de Winkel JG, Dechant M, Valerius T (2011) Recombinant dimeric IgA antibodies against the epidermal growth factor receptor mediate effective tumor cell killing. *J Immunol* 186: 3770-3778
- 13 Weiner GJ (2007) Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res* 39: 271-278
- 30 14 Ascierto PA, Simeone E, Sznol M, Fu YX, Melero I (2010) Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. *Semin Oncol* 37: 508-516
- 15 Cai J, Han S, Qing R, Liao D, Law B, Boulton ME (2011) In pursuit of new anti-angiogenic therapies for cancer treatment. *Front Biosci* 16: 803-814
- 35 16 Govindan SV, Goldenberg DM (2010) New antibody conjugates in cancer therapy. *ScientificWorldJournal* 10: 2070-2089
- 17 Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N (2009) Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 100: 1566-1572
- 18 Hellman L (2007) Regulation of IgE homeostasis, and the identification of potential targets for therapeutic intervention. *Biomed Pharmacother* 61: 34-49
- 40 19 Ravetch JV, Kinet JP (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9: 457-492
- 20 Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R (2002) Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis* 19: 247-258
- 21 Kraft S, Kinet JP (2007) New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol* 7: 365-378
- 45 22 Maenaka K, van der Merwe PA, Stuart DI, Jones EY, Sonderrmann P (2001) The human low affinity Fcγ receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol Chem* 276: 44898-44904

- 23 Gould HJ, Sutton BJ (2008) IgE in allergy and asthma today. *Nat Rev Immunol* 8: 205-217
- 24 Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L (2003) The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Annu Rev Immunol* 21: 579-628
- 5 25 Kinet JP (1999) The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu Rev Immunol* 17: 931-972
- 26 Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29: 1093-1102
- 27 Lewis CE, Pollard JW (2006) Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66: 605-612
- 10 28 Lin EY, Pollard JW (2004) Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90: 2053-2058
- 29 Matsuda H, Watanabe N, Kiso Y, Hirota S, Ushio H, Kannan Y, Azuma M, Koyama H, Kitamura Y (1990) Necessity of IgE antibodies and mast cells for manifestation of resistance against larval *Haemaphysalis longicornis* ticks in mice. *J Immunol* 144: 259-262
- 15 30 Dombrowicz D, Quatannens B, Papin JP, Capron A, Capron M (2000) Expression of a functional FcεRI on rat eosinophils and macrophages. *J Immunol* 165: 1266-1271
- 31 Mossalayi MD, Arock M, Mazier D, Vincendeau P, Vouldoukis I (1999) The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. *Parasitol Today* 15: 342-345
- 20 32 Mossalayi MD, Paul-Eugene N, Ouaz F, Arock M, Kolb JP, Kilchherr E, Debre P, Dugas B (1994) Involvement of FcεRII/CD23 and L-arginine-dependent pathway in IgE-mediated stimulation of human monocyte functions. *Int Immunol* 6: 931-934
- 33 Paul-Eugene N, Mossalayi D, Sarfati M, Yamaoka K, Aubry JP, Bonnefoy JY, Dugas B, Kolb JP (1995) Evidence for a role of FcεRII/CD23 in the IL-4-induced nitric oxide production by normal human mononuclear phagocytes. *Cell Immunol* 163: 314-318
- 25 34 Vouldoukis I, Riveros-Moreno V, Dugas B, Ouaz F, Becherel P, Debre P, Moncada S, Mossalayi MD (1995) The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7804-7808
- 35 Campoli M, Ferrone S, Wang X Functional and clinical relevance of chondroitin sulfate proteoglycan 4. *Adv Cancer Res* 109: 73-121
- 30 36 Maciag PC, Seavey MM, Pan ZK, Ferrone S, Paterson Y (2008) Cancer immunotherapy targeting the high molecular weight melanoma-associated antigen protein results in a broad antitumor response and reduction of pericytes in the tumor vasculature. *Cancer Res* 68: 8066-8075
- 37 Chang CC, Campoli M, Luo W, Zhao W, Zaenker KS, Ferrone S (2004) Immunotherapy of melanoma targeting human high molecular weight melanoma-associated antigen: potential role of nonimmunological mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1028: 340-350
- 35 38 Neri D, Natali PG, Petrucci H, Soldani P, Nicotra MR, Vola R, Rivella A, Creighton AM, Neri P, Mariani M (1996) Recombinant anti-human melanoma antibodies are versatile molecules. *J Invest Dermatol* 107: 164-170
- 39 Ferrone S, Kageshita T (1988) Human high molecular weight-melanoma associated antigen as a target for active specific immunotherapy--a phase I clinical trial with murine antiidiotypic monoclonal antibodies. *J Dermatol* 15: 457-465
- 40 40 Hafner C, Breiteneder H, Ferrone S, Thallinger C, Wagner S, Schmidt WM, Jasinska J, Kundi M, Wolff K, Zielinski CC et al (2005) Suppression of human melanoma tumor growth in SCID mice by a human high molecular weight-melanoma associated antigen (HMW-MAA) specific monoclonal antibody. *Int J Cancer* 114: 426-432
- 45 41 Imai K, Nakanishi T, Noguchi T, Yachi A, Ferrone S (1983) Selective in vitro toxicity of puromycin conjugated to the monoclonal antibody 225.28S to a human high-molecular-weight melanoma-associated antigen. *Cancer Immunol Immunother* 15: 206-209
- 42 Matsui M, Nakanishi T, Noguchi T, Imai K, Yachi A, Ferrone S (1985) Suppression of human melanoma growth in nude mice injected with anti high-molecular-weight melanoma-associated antigen monoclonal antibody 225.28S conjugated to puromycin. *Jpn J Cancer Res* 76: 119-123
- 50

- 43 Gould HJ, Mackay GA, Karagiannis SN, O'Toole CM, Marsh PJ, Daniel BE, Coney LR, Zurawski VR, Jr., Joseph M, Capron M et al (1999) Comparison of IgE and IgG antibody-dependent cytotoxicity in vitro and in a SCID mouse xenograft model of ovarian carcinoma. *Eur J Immunol* 29: 3527-3537
- 5 44 Karagiannis P, Singer J, Hunt J, Gan SK, Rudman SM, Mechtcheriakova D, Knittelfelder R, Daniels TR, Hobson PS, Bevil AJ et al (2009) Characterisation of an engineered trastuzumab IgE antibody and effector cell mechanisms targeting HER2/neu-positive tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 58: 915-930
- 45 Karagiannis SN, Bracher MG, Bevil RL, Bevil AJ, Hunt J, McCloskey N, Thompson RG, East N, Burke F, Sutton BJ et al (2008) Role of IgE receptors in IgE antibody-dependent cytotoxicity and phagocytosis of ovarian tumor cells by human monocytic cells. *Cancer Immunol Immunother* 57: 247-263
- 10 46 Karagiannis SN, Bracher MG, Hunt J, McCloskey N, Bevil RL, Bevil AJ, Fear DJ, Thompson RG, East N, Burke F et al (2007) IgE-antibody-dependent immunotherapy of solid tumors: cytotoxic and phagocytic mechanisms of eradication of ovarian cancer cells. *J Immunol* 179: 2832-2843
- 15 47 Karagiannis SN, Wang Q, East N, Burke F, Riffard S, Bracher MG, Thompson RG, Durham SR, Schwartz LB, Balkwill FR et al (2003) Activity of human monocytes in IgE antibody-dependent surveillance and killing of ovarian tumor cells. *Eur J Immunol* 33: 1030-1040

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para el uso en el tratamiento del melanoma maligno, en el que el anticuerpo es capaz de:
 - (a) unirse de manera específica al antígeno asociado a melanoma de peso molecular elevado (HMW-MAA); y
 - (b) unirse a un receptor de Fcε, en el que el anticuerpo es del isotipo IgE y comprende una cadena pesada ε.
- 5 2. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende una o más regiones variables capaces de unirse de manera específica a HMW-MAA, y una o más regiones constantes capaces de unirse a un receptor de Fcε.
3. El anticuerpo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
- 10 4. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 2 o 3, en el que los dominios variables o las CDRs derivan de una primera especie de mamífero, y las regiones estructurales y/o los dominios constantes derivan de una segunda especie de mamífero diferente de la primera especie de mamífero.
5. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 4, en el que las regiones variables o CDRs derivan de una especie no humana, y las regiones estructurales y/o los dominios constantes derivan de un ser humano.
- 15 6. El anticuerpo para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las regiones variables o CDRs derivan de un humano, y las regiones estructurales y/o los dominios constantes derivan de un ser humano.
7. El anticuerpo para el uso según cualquier reivindicación precedente, que comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada seleccionados del grupo que consiste en Cε1, Cε2, Cε3, y Cε4.
- 20 8. El anticuerpo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo se conjuga a un marcador detectable o un agente terapéutico, preferiblemente una citotoxina, un agente de encapsulación o un resto radiactivo.
9. El anticuerpo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el anticuerpo comprende una o más secuencias de CDR de la cadena pesada seleccionadas de SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19 y SEQ ID N°: 20, y una o más secuencias de CDR de la cadena ligera seleccionadas de SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y SEQ ID N°: 23, o en el que el anticuerpo comprende (i) un dominio VH codificado mediante una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:11, o (ii) un dominio VH que comprende SEQ ID N°:4, o en el que el anticuerpo comprende (i) un dominio VL codificado mediante una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID N°:5 o SEQ ID N°: 12, o (ii) un dominio VL que comprende SEQ ID N°:6, o en el que el anticuerpo comprende (i) una cadena pesada codificada mediante una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID N°: 9, o (ii) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en SEQ ID N°:7, o

30 en el que el anticuerpo comprende (i) una cadena ligera codificada mediante una secuencia de nucleótidos que comprende SEQ ID N°: 10, o (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en SEQ ID N°:8, o

35 en el que el anticuerpo comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada codificados mediante SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°:14, SEQ ID N°:15 y/o SEQ ID N°: 16, o

en el que el anticuerpo comprende un dominio constante de la cadena ligera codificado mediante SEQ ID N°: 17.
10. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 9, en el que el anticuerpo comprende las secuencias de CDR de la cadena pesada definidas en SEQ ID N°s: 18, 19 y 20, y las secuencias de CDR de la cadena ligera definidas en SEQ ID N°s:21, 22 y 23.
- 40 11. El anticuerpo para el uso según cualquier reivindicación precedente, en el que el cáncer expresa HMW-MAA.

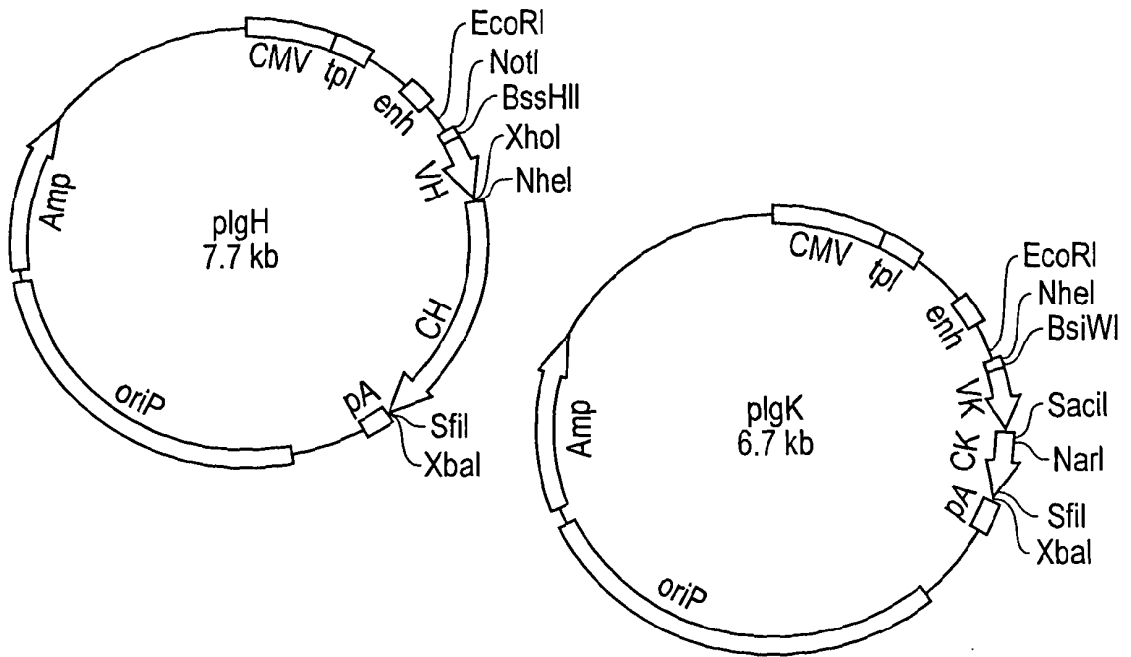


FIG. 1A

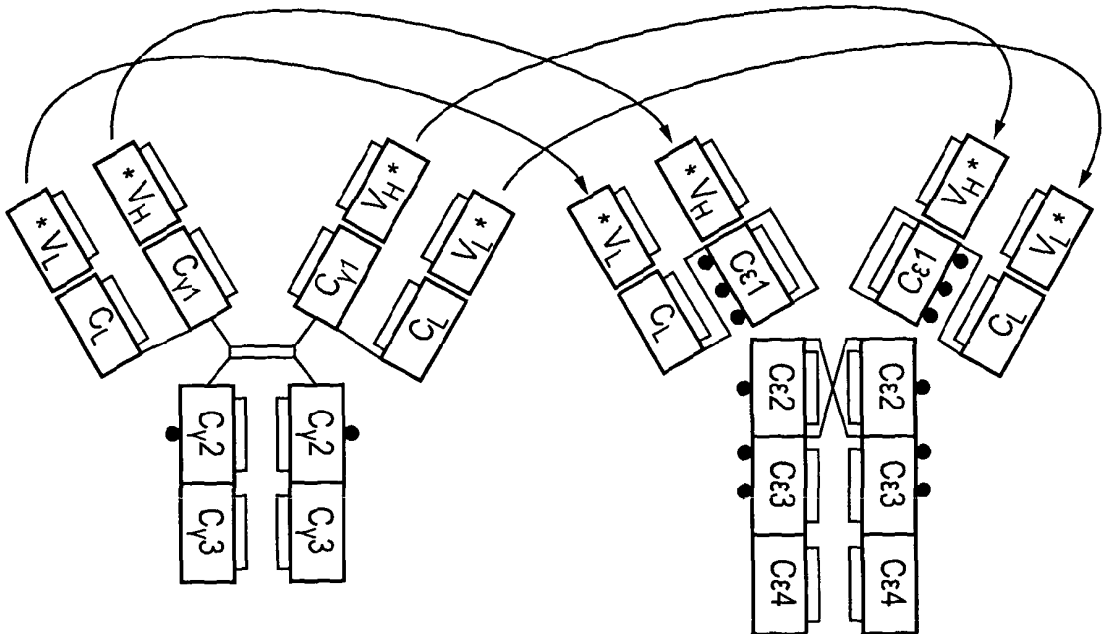
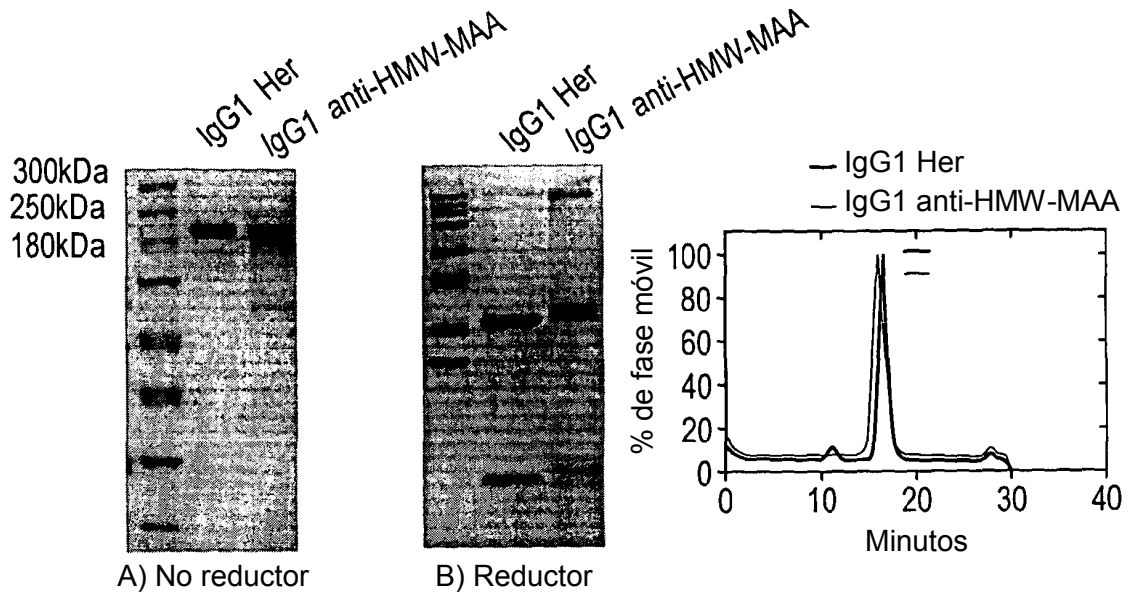


FIG. 1B



SDS-Page

HPLC

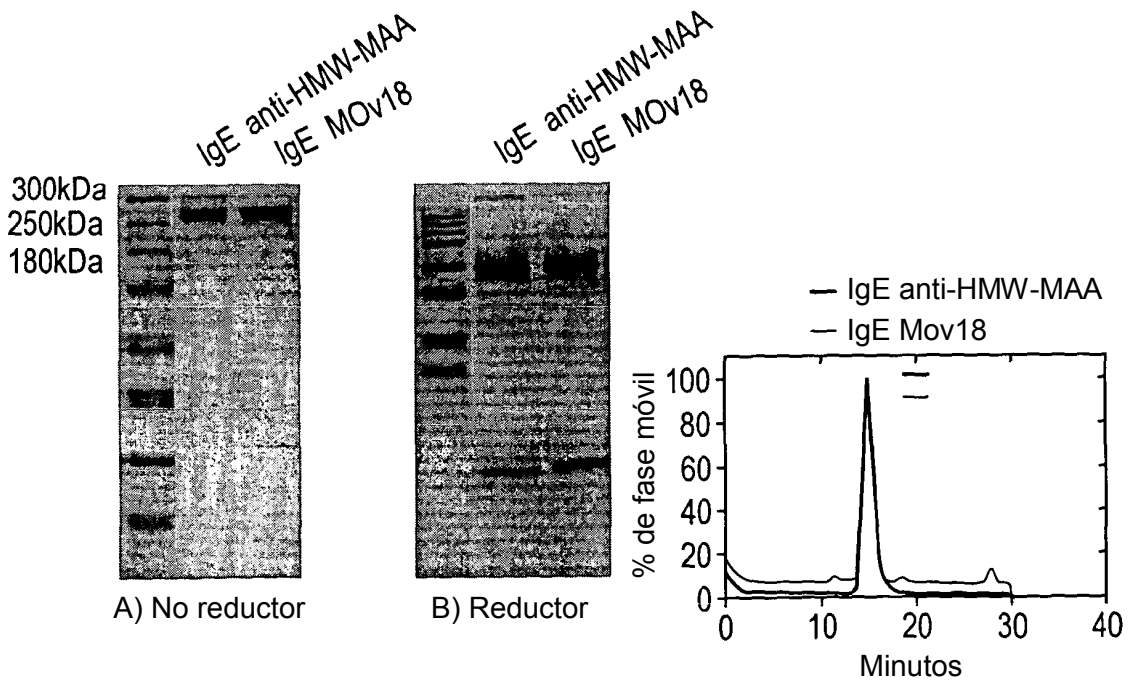


FIG. 2

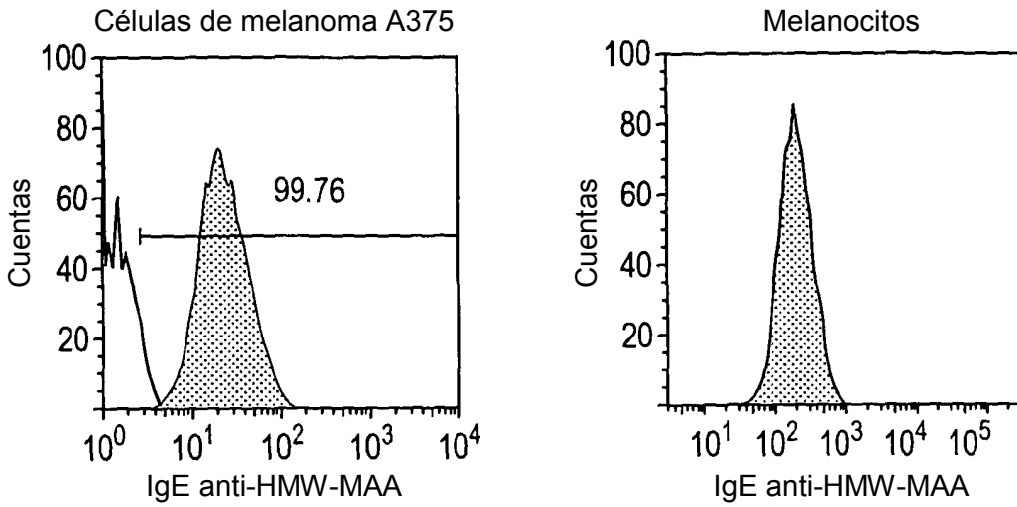


FIG. 3A

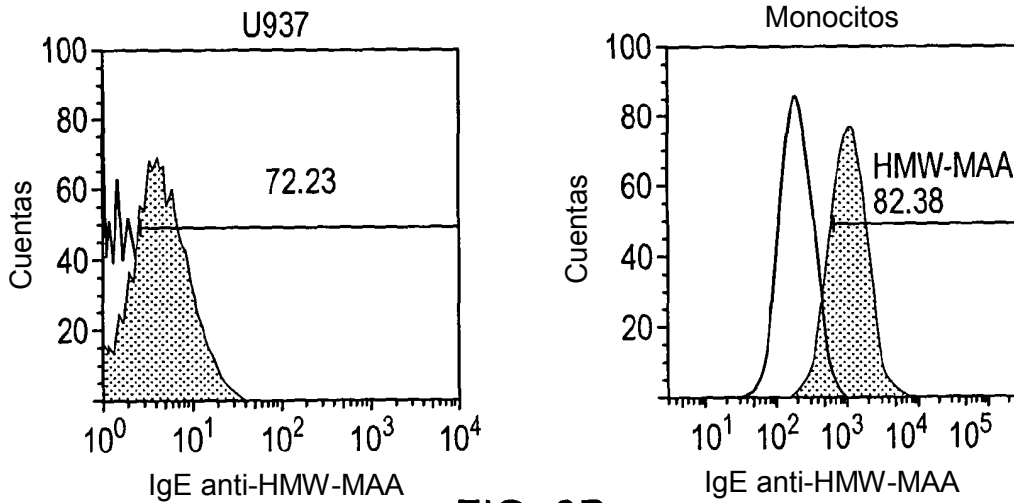


FIG. 3B

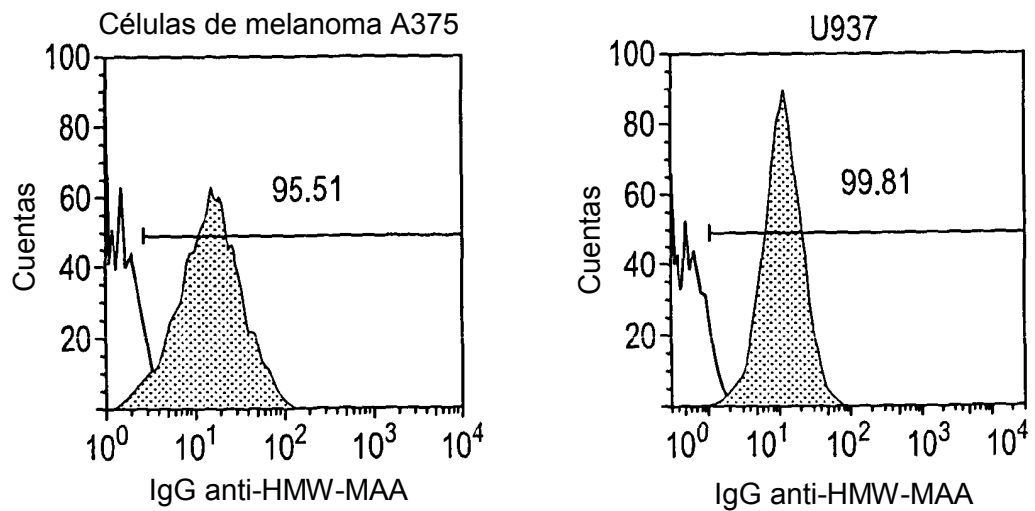


FIG. 3C

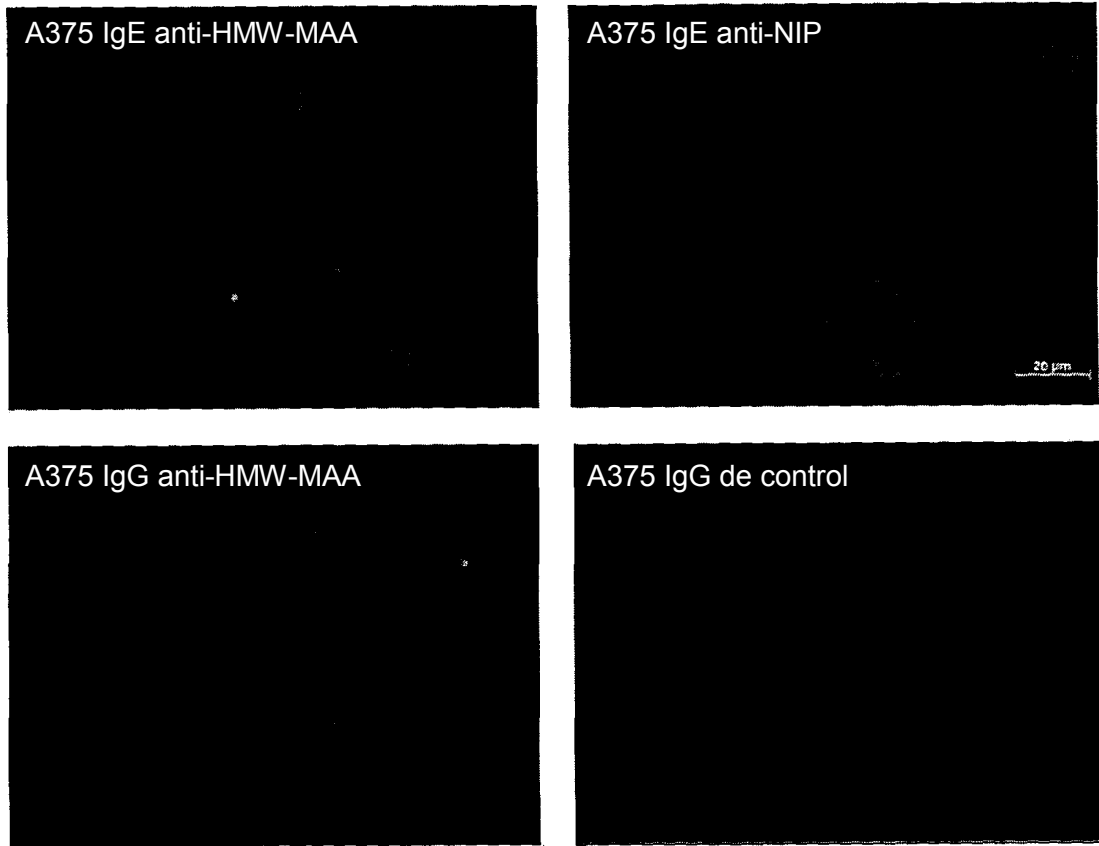


FIG. 4

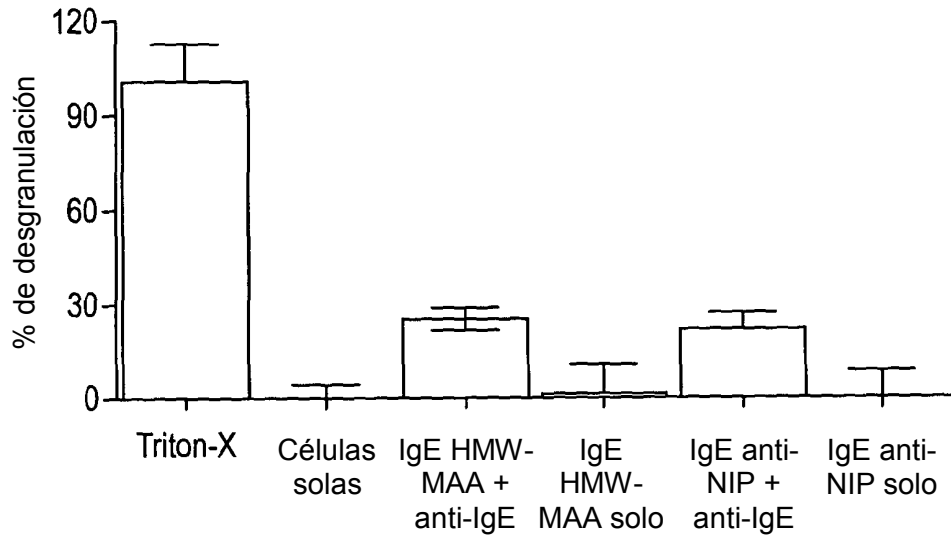


FIG. 5A

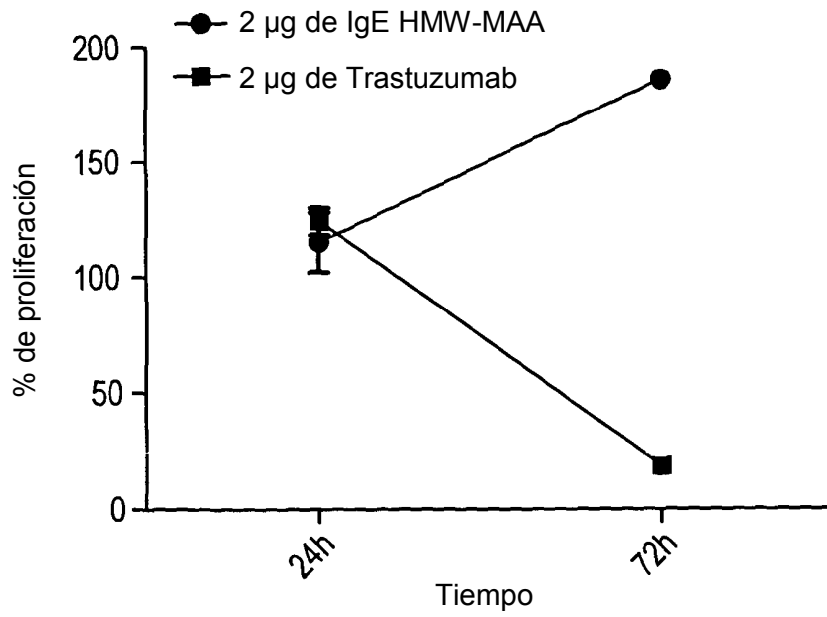


FIG. 5B

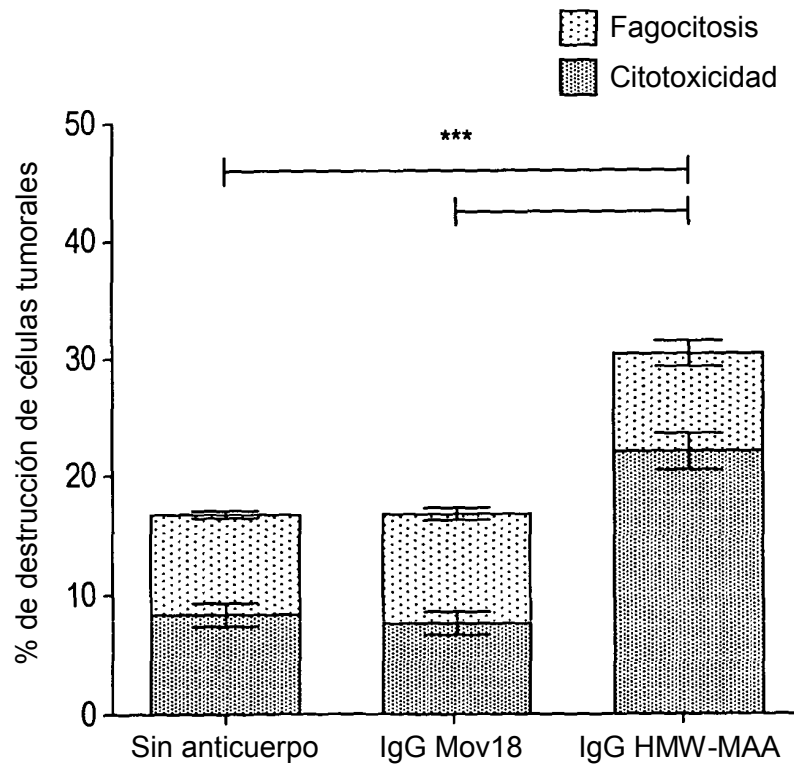
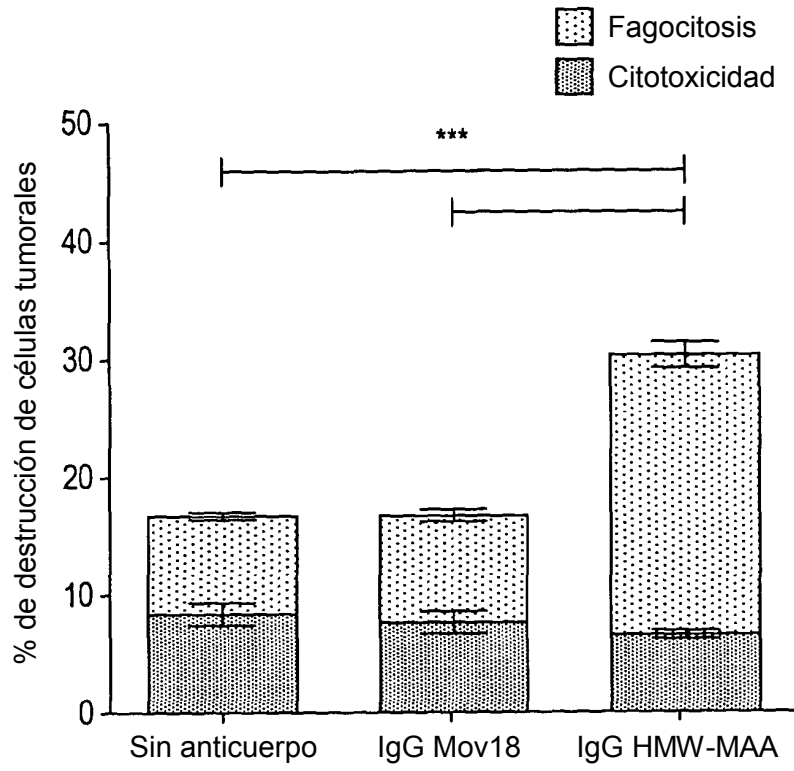


FIG. 6

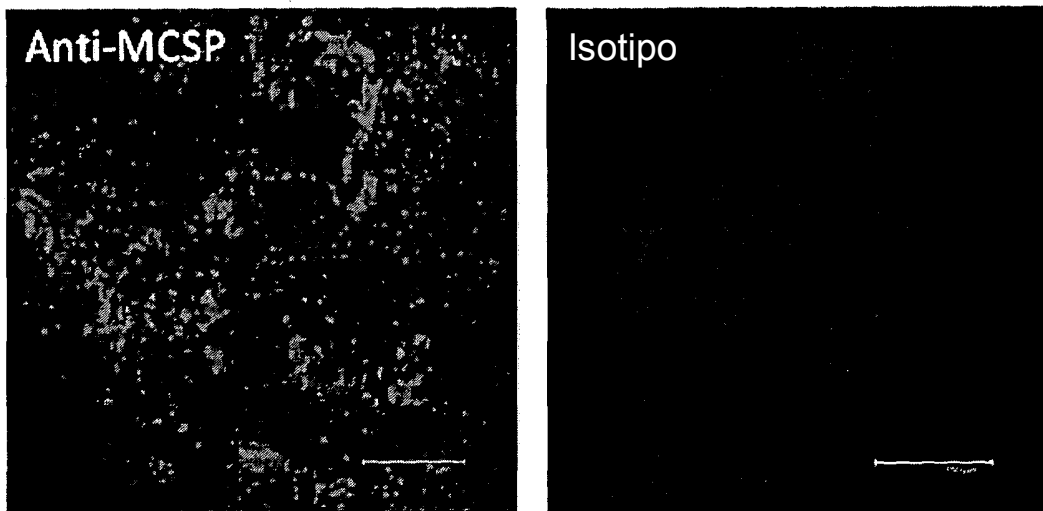


FIG. 7

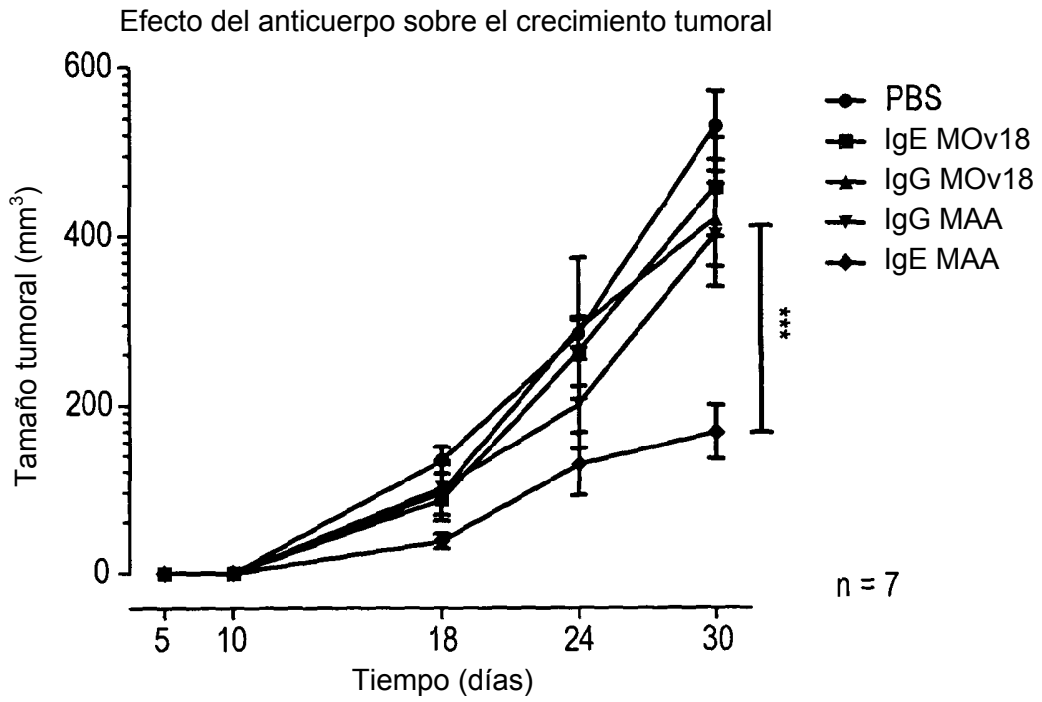


FIG. 8A

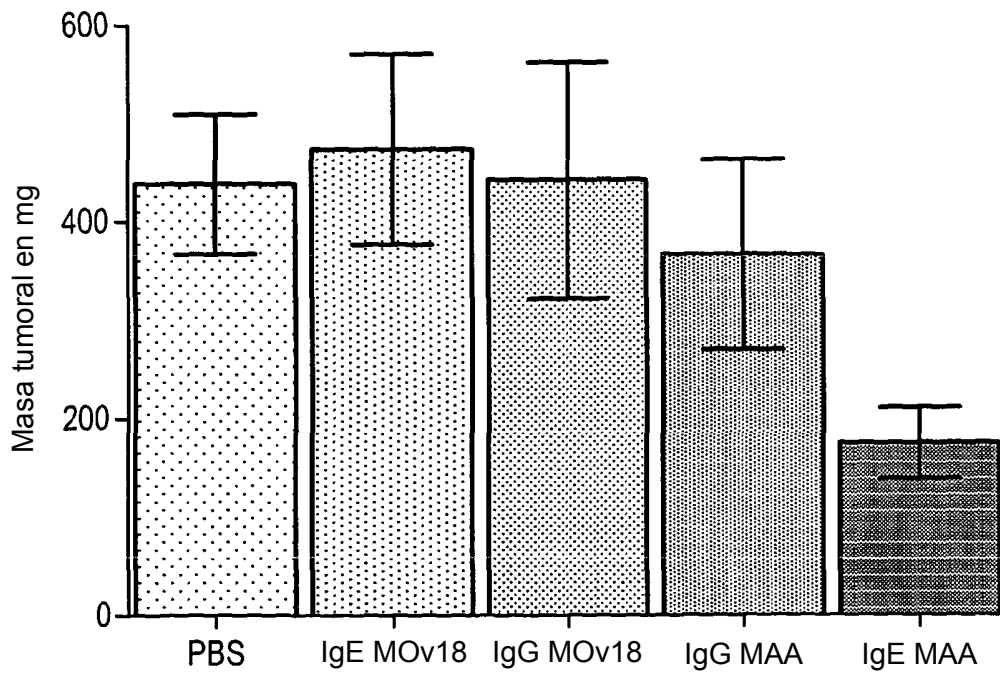


FIG. 8B

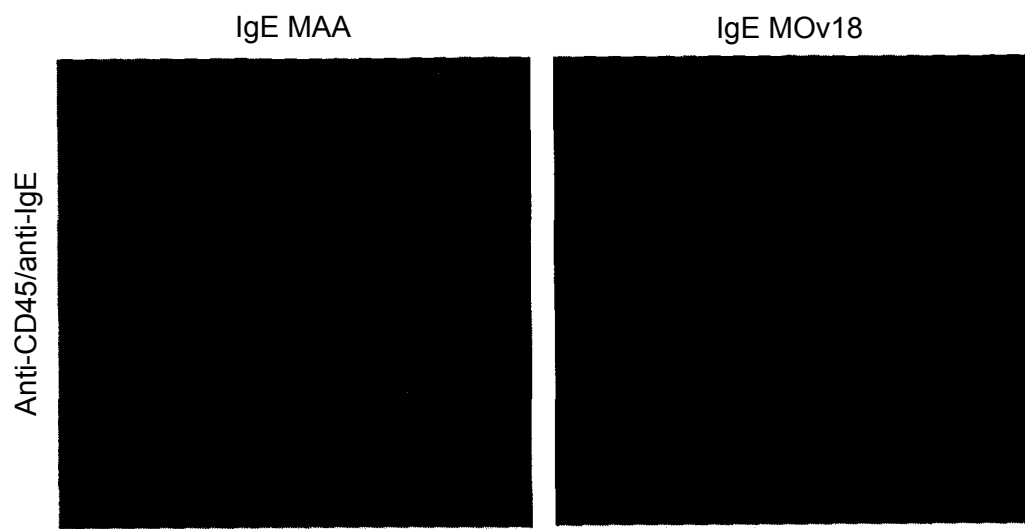


FIG. 9

SEQ ID NO:1

1 MQSGPRPPLP APGLALALTL TMLARLASAA SFFGENHLEV PVATALTDID LQLQFSTSQP
 61 EALLLLAAGP ADHLLLQLYS GRLQVRLVLG QEELRLQTPA ETLLSDSIPH TVVLTVVEGW
 121 ATLSVDGFLN ASSAVPGAPL EVPYGLFVGG TGTLGLPYLR GTSRPLRGCL HAATLNGRSL
 181 LRPLTPDVHE GCAEEFSASD DVALGFSGPH SLAAFPWGT QDEGTLEFTL TTQSRQAPLA
 241 FQAGRRGDF IYVDIFEGHL RAVVEKQGT VLLHNSVPVA DGQPHEVSVH INAHRLEISV
 301 DQYPTHTSNR GVLSYLEPRG SLLGGGLDAE ASRHLQEHRL GLTPEATNAS LLGCMEDLSV
 361 NGQRRGLREA LLTRNMAAGC RLEEEYEDD AYGHYEFST LAPEAWPAME LPEPCVPEPG
 421 LPPVFANFTQ LLTISPLVVA EGGTAWLEWR HVQPTLDLME AELRKSQVLF SVTRGARHGE
 481 LELDIPGAQA RKMFTLLDVV NRKARFIHDG SEDTSDQLVL EVSVTARVPM PSCLRRGQTY
 541 LLPIQVNPVN DPPHIFPHG SLMVILEHTQ KPLGPEVFQA YDPDSACEGL TFQVLGTSSG
 601 LPVERRDQPG EPATEFSCRE LEAGSLVYVH RGGPAQDLTF RVSDGLQASP PATLKVVAIR
 661 PAIQIHRSTG LRLAQQSAMP ILPANLSVET NAVGQDVSVL FRVTGALQFG ELQKQGAGGV
 721 EGAEWATQA FHQRDVEQGR VRYLSTDPQH HAYDTVENLA LEVQVQGEIL SNLSFPVTIQ
 781 RATVWMLRLE PLHTQNTQQE TLTTAHLEAT LEEAGPSPPT FHVEVQAPR KGNLQLQGTR
 841 LSDGQGFTQD DIQAGRVTYG ATARASEAVE DTFRFRVTAP PYFSPLYTFP IHIGGDPDAP
 901 VLTNVLVVP EGGEGVLSAD HLFVKSLSA SYLYEVMERP RHGRLAWRGT QDKTTMVTSE
 961 TNEDLLRGRV VYQHDDSETT EDDIPFVATR QGESSGDMAW EEVRGVFRVA IQPVNDHAPV
 1021 QTISRIFHVA RGGRRLLTD DVAFSDADSG FADAQLVLTR KDLLFGSIVA VDEPTRPIYR
 1081 FTQEDLRKRR VLFVHSGADR GWIQLQVSDG QHQATALLEV QASEPYLRVA NGSSLVVPOG
 1141 GQGTIDTAVL HLDTNLDIRS GDEVHYHVTA GPRWGQLVRA GQPATAFSQQ DLLDGAVALYS
 1201 HNGSLSPRDT MAFSVEAGPV HTDATLQVTI ALEGPLAPLK LVRHKKIYVF QGEAAEIRRD
 1261 QLEAAQEAVP PADIVFSVKS PPSAGYLMV SRGALADEPP SLDPVQSFQ EAVDTGRVLY
 1321 LHSRPEAWS DAFSLDVASGL GAPLEGVLVE LEVLPAAIPL EAQNFVPEG GSLTLAPPLL
 1381 RVSGPYFPTL LGLSLQVLEP PQHGALQKED GPQARTLSAF SWRMVEEQLI RYVHDGSETL
 1441 TDSFVLMANA SEMDRQSHPV AFTVTVLPVN DQPPILTNT GLQMWEGATA PIPAEALRST
 1501 DGDSGSEDLV YTIEQPSNGR VVLRGAPGTE VRSFTQAQLD GGLVLFSHRG TLDGGFRFRL
 1561 SDGEHTSPGH FFRVTAQKQV LLSLKGSQTL TVCPGSVQPL SSQTLRASS AGTDPQLLLY
 1621 RVVRGPQLGR LFHAQQDSTG EALVNFTQAE VYAGNILYEH EMPPEPFWEA HDTLELQLSS
 1681 PPARVAATL AVAVSFEAAC PQRPSHLWKN KGLWVPEGQR ARITVAALDA SNLLASVPSF
 1741 QRSEHDVLFQ VTQFP SRGQL LVSEEPHAG QPHFLQSQLA AGQLVYAHGG GGTQQDGFHF
 1801 RAHLQGPAGA SVAGPQTSEA FAITVRDVNE RPPQPQASVP LRLTRGSRAP ISRAQLSVVD
 1861 PDSAPGEIEY EVQRAPHNGF LSLVGGGLGP VTRFTQADVD SGRLAFVANG SSVAGIFQLS
 1921 MSDGASPLP MSLAVDILPS AIEVQLRAPL EVPQALGRSS LSQQQLRVVS DREEPEAYR
 1981 LIQGPQYGH L VGGRP T SAF SQFQIDQGEV VFAFTNFSS HDHFRVLALA RGVNASAVVN
 2041 VTVRALLHVW AGGPWPQGAT LRLDPTVLDA GELANRTGSV PRFRLEEGPR HGRVVRVPR
 2101 RTEPGGSQLV EQFTQQDLED GRLGLEVGRP EGRAPGPAGD SLTLELWAQG VPPAVASLDF
 2161 ATEPYNAARP YSVALLSVPE AARTEAGKPE SSTPTGEPGP MASSPEPAVA KGGFLSFLEA
 2221 NMFSVII PMC LVLLLLALIL PLLFYLRKRN KTGKHDVQVL TAKPRNGLAG DTETFRKVEP
 2281 GQAIPLTAVP GQGPPGGQP DPELLQFCRT PNPALKNGQY WV

FIG. 10

SEQ ID NO:2

1 atgcagtccg ggcgcgggcc cccacttcca gccccgggcc tggccttggc tttgaccctg
 61 actatgttgg ccagacttgc atccgoggct tccttcttcg gtgagaacca cctggagggtg
 121 cctgtggcca cggctctgac cgacatagac ctgcagctgc agttctccac gtcccagccc
 181 gaagccctcc ttctcctggc agcaggccca gctgaccacc tcctgctgca gctctactct
 241 ggacgcctgc aggtcagact tgttctgggc caggaggagc tgaggctgca gactccagca
 301 gagacgctgc tgagtgactc catccccac actgtggtgc tgactgtcgt agagggctgg
 361 gccacgttgt cagtcgatgg gtttctgaac gcctcctcag cagtcccagg agcccccta
 421 gaggtcccct atgggctctt tgttgggggc actgggaccc ttggcctgcc ctacctgagg
 481 ggaaccagcc gaccctgag gggttgcctc catgcagcca cctcaatgg ccgcagcctc
 541 ctccggcctc tgacccccga tgtgcatgag ggctgtgctg aagagtttcc tgccagtgat
 601 gatgtggccc tgggcttctc tgggccccac tctctggctg ccttccctgc ctggggcact
 661 caggacgaag gaaccctaga gtttacactc accacacaga gccggcaggc acccttggcc
 721 ttccaggcag ggggccggcg tggggacttc atctatgtgg acatatttga gggccacctg
 781 cgggccgtgg tggagaaggg ccagggtacc gtattgctcc acaacagtgt gcctgtggcc
 841 gatgggcagc cccatgaggc cagtgtccac atcaatgctc accggctgga aatctccgtg
 901 gaccagtacc ctacgcatac ttcgaaccga ggagtcctca gctacctgga gccacggggc
 961 agtctccttc tcgggggggt ggatgcagag gcctctcgtc acctccagga acaccgctg
 1021 ggctgacac cagaggccac caatgcctcc ctgctgggct gcatggaaga cctcagtgtc
 1081 aatggccaga ggcgggggct gcggaagct ttgctgacgc gcaacatggc agccggctgc
 1141 aggctggagg aggaggagta tgaggacgat gcctatggac attatgaagc tttctccacc
 1201 ctggcccctg aggcttggcc agccatggag ctgctgagc catgctgctc tgagccaggg
 1261 ctgcctcctg tctttgcca tttcaccag ctgctgacta tcagcccact ggtggtggcc
 1321 gaggggggca cagcctggct tgagtggagg catgtgcagc ccacgctgga cctgatggag
 1381 gctgagctgc gcaaatccca ggtgctgttc agcgtgaccc gaggggcacg ccatggcgag
 1441 ctcgagctgg acatcccggg agcccaggca cgaaaaatgt tcacctcct ggacgtgggtg
 1501 aaccgcaagg cccgcttcat ccacgatggc tctgaggaca cctccgacca gctggtgctg
 1561 gaggtgtcgg tgacggctcg ggtgcccatg ccctcatgcc ttcggagggg ccaacatac
 1621 ctctgccc tccaggtcaa ccctgtcaat gacccacccc acatcatctt cccacatggc
 1681 agcctcatgg tgatcctgga acacacgcag aagccgctgg ggctgaggt tttccagggc
 1741 tatgaccggg actctgctg tgagggcctc accttccagg tccttggcac ctctctggc
 1801 ctccccgtgg agcgcgaga ccagcctggg gagccggcga ccgagttctc ctgccgggag
 1861 ttggaggccg gcagcctagt ctatgtccac cgcggtggtc ctgcacagga cttgacgttc
 1921 cgggtcagcg atggactgca ggccagcccc ccggccacgc tgaaggtggt ggccatccgg
 1981 ccggccatac agatccaccg cagcacaggg ttgcgactgg cccaaggctc tgccatgccc
 2041 atcttgccc ccaacctgtc ggtggagacc aatgccgtgg ggcaggatgt gagcgtgctg
 2101 ttccgcgtca ctggggccct gcagtttggg gagctgcaga agcagggggc aggtgggggtg
 2161 gaggggtgctg agtgggtggc cacacaggcg ttccaccagc gggatgtgga gcagggccgc
 2221 gtgaggtacc tgagcactga cccacagcac cacgcttacg acaccgtgga gaacctggcc
 2281 ctggagggtgc aggtgggcca ggagatcctg agcaatctgt ccttcccagt gaccatccag
 2341 agagccactg tgtggatgct gcggtgggag cactgcaca ctcagaacac ccagcaggag
 2401 accctacca cagcccacct ggaggccacc ctggaggagg caggcccaag ccccccaacc

FIG. 11 (continuación)

2461 ttccattatg aggtggttca ggctcccagg aaaggcaacc ttcaactaca gggcacaagg
 2521 ctgtcagatg gccagggctt caccaggat gacatacagg ctggccgggt gacctatggg
 2581 gccacagcac gtgcctcaga ggcagtcgag gacaccttcc gtttccgtgt cacagctcca
 2641 ccatatttct cccactcta taccttcccc atccacattg gtggtgacct agatgagcct
 2701 gtcctacca atgtcctcct cgtggtgcct gaggggtggtg aggggtgcct ctctgctgac
 2761 cacctctttg tcaagagtct caacagtgcc agctacctct atgaggteat ggagcggccc
 2821 cgccatggga ggttggcttg gcgtgggaca caggacaaga ccaactatgg gacatccttc
 2881 accaatgaag acctgttgcg tggccggctg gtctaccagc atgatgactc cgagaccaca
 2941 gaagatgata tcccatttgt tgetaccgc cagggcgaga gcagtgggta catggcctgg
 3001 gaggaggtac ggggtgtctt ccgagtggcc atccagccg tgaatgacca cgcccctgtg
 3061 cagaccatca gccgatctt ccatgtggcc cggggtgggc ggcgctgct gactacagac
 3121 gacgtggcct tcagcgatgc tgactcgggc tttgctgacg cccagctggt gcttaccgc
 3181 aaggacctcc tctttggcag tatcgtggcc gtagatgagc ccacgcggcc catctaccgc
 3241 ttaccccagg aggacctcag gaagaggcga gtactgttcg tgcactcagg ggtgacctg
 3301 ggctggatcc agctgcaggt gtccgacggg caacaccagg ccaactgcgt gctggagggtg
 3361 caggcctcgg aaccctacct ccgtgtggcc aacggctcca gccttgtggt ccctcaagga
 3421 ggccagggca ccatcgacac ggccgtgctc cacctggaca ccaacctcga catccgcagt
 3481 ggggatgagg tccactacca cgtcacagct ggccctcgct ggggacagct agtccgggct
 3541 ggtcagccag ccacagcctt ctcccagcag gacctgctgg atggggccgt tctctatagc
 3601 cacaatggca gcctcagccc ccgcgacacc atggccttct ccgtggaagc agggccagtg
 3661 cacacggatg ccaccctaca agtgaccatt gccctagagg gccactggc cccactgaag
 3721 ctggtccggc acaagaagat ctacgtcttc cagggagagg cagctgagat cagaagggac
 3781 cagctggagg cagcccagga ggcagtcca cctgcagaca tcgtattctc agtgaagagc
 3841 ccaccgagtg ccggctacct ggtgatggtg tcgctggtg ccttggcaga tgagccacc
 3901 agcctggacc ctgtgcagag cttctcccag gaggcagtgg acacaggcag ggtcctgtac
 3961 ctgactccc gccctgaggc ctggagcgat gccttctcgc tggatgtggc ctcaggcctg
 4021 ggtgctcccc tcgagggcgt ccttgtggag ctggaggtgc tgcccctgc catcccacta
 4081 gaggcgcaaa acttcagcgt ccctgagggt ggcagcctca cctggcccc tccactgctc
 4141 cgtgtctccg ggccctaact cccactctc ctgggcctca gcctgcaggt gctggagcca
 4201 cccagcatg gagccctgca gaaggaggac ggacctcaag ccaggacct cagcgccttc
 4261 tcctggagaa tgggtgaaga gcagctgatc cgctacgtgc atgacgggag cgagacactg
 4321 acagacagtt ttgtcctgat ggctaagcc tccgagatgg atcgccagag ccactcctgtg
 4381 gccttactg tcaactgtcct gcctgtcaat gaccaacccc ccatcctcac taaaacaca
 4441 ggctgcaga tgtgggaggg ggccactgcg cccatccctg cggaggctct gaggagcacg
 4501 gacggcgact ctgggtctga ggatctggtc tacaccatcg agcagcccag caacgggagg
 4561 gtagtgctgc ggggggcgcc gggcactgag gtgctcagct tcacgcaggc ccagctggac
 4621 ggccggctcg tgctgttctc acacagagga accctggatg gaggcttccg cttccgcctc
 4681 tctgacggcg agcacactc cccggacac ttcttccgag tgacggccca gaagcaagtg
 4741 ctctctcgc tgaagggcag ccagacactg actgtctgcc cagggctcgt ccagccactc
 4801 agcagtcaga ccctcagggc cagctccagc gcaggcactg acccccagct cctgctctac
 4861 cgtgtggtgc ggggccccca gctaggccgg ctgttccaag ccagcagga cagcacaggg
 4921 gaggccctgg tgaacttcac tcaggcagag gtctacgtg ggaatattct gtatgagcat
 4981 gagatgcccc ccgagccctt ttggaggcc catgataccc tagagctcca gctgtcctcg
 5041 ccgctgccc gggacgtggc cgccaccctt gctgtggctg tgtcttttga ggtgctgctg

FIG. 11 (continuación)

5101 cccagcgcc ccagccacct ctggaagaac aaaggtctct gggccccga gggccagcgg
 5161 gccaggatca ccgtggctgc tctggatgcc tccaatctct tggccagcgt tccatcacc
 5221 cagcgctcag agcatgatgt gctcttccag gtcacacagt tccccagccg gggccagctg
 5281 ttgggtgccg aggagcccct ccatgctggg cagccccact tctgcagtc ccagctggct
 5341 gcagggcagc tagtgtatgc ccacggcggg gggggcacc agcaggatgg cttccacttt
 5401 cgtgccacc tccaggggcc agcaggggcc tccgtggctg gaccccaaac ctcagaggcc
 5461 tttgccatca cggtgagggg tgtaaatgag cggccccctc agccacaggc ctctgtccca
 5521 ctccggctca cccgaggctc tctgcccc atctcccggg cccagctgag tgtggtggac
 5581 ccagactcag ctctggggg gattgagtac gaggtccagc gggcaccaca caacggcttc
 5641 ctcagcctgg tgggtggtgg cctggggccc gtgaccgct tcacgcaagc cgatgtggat
 5701 tcagggcggc tggccttctg ggccaacggg agcagcgtgg caggcatctt ccagctgagc
 5761 atgtctgatg gggccagccc accctgccc atgtccctgg ctgtggacat cctaccatcc
 5821 gccatcgagg tgcagctgcg ggcaccctg gaggtgccc aagctttggg gcgctcctca
 5881 ctgagccagc agcagctccg ggtggtttca gatcgggagg agccagaggc agcataccgc
 5941 ctcacccagg gacccagta tgggcatctc ctggtggcg ggcggcccac ctcggccttc
 6001 agccaattcc agatagacca gggcgagggt gtctttgctt tcaccaactt ctctcctct
 6061 catgaccact tcagagtcct ggcactggct aggggtgtca atgcatcagc cgtagtgaac
 6121 gtcactgtga gggctctgct gcatgtgtgg gcagggtggc catggcccca gggtgccacc
 6181 ctgcgcttgg accccaccgt cctagatgct ggcgagctgg ccaaccgcac aggcagtgtg
 6241 ccgccttcc gcctcctgga gggaccccgg catggccgcg tggccgcgt gccccgagcc
 6301 aggacggagc ccgggggagc ccagctggtg gagcagttca ctcagcagga ccttgaggac
 6361 gggaggctgg ggctggaggt gggcaggcca gaggggaggg cccccggccc cgcagggtgac
 6421 agtctcactc tggagctgtg ggcacagggc gtcccgcctg ctgtggcctc cctggacttt
 6481 gccactgagc cttacaatgc tgcccggccc tacagcgtgg ccctgctcag tgtccccgag
 6541 gccgcccgga cggaaagcag gaagccagag agcagcacc ccacaggcga gccaggcccc
 6601 atggcatcca gccctgagcc cgctgtggcc aagggaggct tctgagctt ccttgaggcc
 6661 aacatgttca gcgtcatcat ccccatgtgc ctggtacttc tgctcctggc gctcatcctg
 6721 cccctgctct tctacctccg aaaacgcaac aagacgggca agcatgacgt ccaggctctg
 6781 actgccaagc cccgcaacgg cctggctggt gacaccgaga cctttcgcaa ggtggagcca
 6841 ggccaggcca tcccgtcac agctgtgcct ggccaggggc cccctccagg aggccagcct
 6901 gaccagagc tgctgcagtt ctgccggaca cccaacctg cccttaagaa tggccagtac
 6961 tgggtgtga

FIG. 11 (continuación)

SEQ ID NO:3

GCCATGGCCCAGGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGAGGGGGCTTGGTGCAACCTG
GAGGATCCATGAACTCTCCTGTGTTGTCTCTGGATTCACTTTCAGTAATTACT
GGATGAACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGATTGCAGA
AATTAGATTGAAATCCAATAATTTTGAAGATATTATGCGGAGTCTGTGAAAG
GGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGCCTACCTGCAAATG
ATCAACCTAAGAGCTGAAGATACTGGCATTATTACTGTACCAGTTATGGTAA
CTACGTTGGGCACTATTTTGACCACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT
CGAGT

FIG. 12

SEQ ID NO:4

AMAQVKLQQSGGGLVQPGGSMKLSCVVSFGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWIA
EIRLKSNNFGRYYAESVKGRFTISRDDSKSSAYLQMINLRAEDTGIYYCTSYGNYV
GHYFDHWGQGTTVTVSS

FIG. 13

SEQ ID NO:5

GATATCGAGCTCACCCAATCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAG
GGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGATACTAATGTAGCGTGGT
ATCAACAAAAACCAGGGCAATCTCCTGAACCACTGCTTTTCTCGGCATCCTAC
CGTTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATT
CACTCTACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTC
AGCAATATAACAGCTATCCTCTGACGTTCCGGTGGCGGCACCAAGCTGGAAATC
AAACGGGCGGCCGCAGAA

FIG. 14

SEQ ID NO:6

DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWYQQKPGQSPEPLLFSASYRY
TGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIKRAAA
E

FIG. 15

SEQ ID NO:7

QVKLQQSGGGLVQPGGSMKLSCVVSGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWIAE
IRLKSNNFGRYYAESVKGRFTISRDDSKSSAYLQMINLRAEDTGIYYCTSYGN
YVGHYFDHWGQGTTVTVSSASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYF
PEPVMVTWDTGSLNGTTMTLPATTLTLSGHYATISLLTVSGAWAKOMFTCRVAH
TPSSTDWVDNKTFVCSRDFTPPTVKILOSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINI
TWLEDGQVMDVDLSTASTTOEGELASTOSELTSQKHWLSDRTYTCOVTYOGHT
FEDSTKKCADSNPRGVSA YLSRPSFDLFIKRSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSR
ASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALM
RSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQL
PDARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEAASPSQTV
ORAVSVNPGK

FIG. 16

SEQ ID NO:8

DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVDTNVAWYQQKPGQSPEPLLSAS
YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGGGTKLE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEOLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALOSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 17

SEQ ID NO:9

CAAGTCAAACCTGCAGCAGAGCGGTGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGTGGCA
 GCATGAAGCTGAGCTGCGTCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACTGG
 ATGAACTGGGTCCGGCAGAGCCCCGAGAAGGGCCTGGAATGGATCGCCG
 AGATCCGGCTGAAAAGCAACAACCTTCGGCCGGTACTACGCCGAGAGCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAGCAGCGCCTAC
 CTGCAGATGATCAACCTGCGGGCCGAGGACACCGGCATCTACTACTGCA
 CCAGCTACGGCAACTACGTGGGCCACTACTTCGACCACTGGGGCCAGGG
 CACCACCGTGACTGTCAGCAGCGCTAGCACACAGAGCCCATCCGTCTTCCC
CTTGACCCGCTGCTGCAAAAACATTCCCTCCAATGCCACCTCCGTGACTCTGG
GCTGCCTGGCCACGGGCTACTTCCCGGAGCCGGTGATGGTGACCTGGGACACA
GGTCCCTCAACGGGACAACCTATGACCTTACCAGCCACCACCTCACGCTCTC
TGGTCACTATGCCACCATCAGCTTGCTGACCGTCTCGGGTGCGTGGGCCAAGC
AGATGTTACCTGCCGTGTGGCACACACTCCATCGTCCACAGACTGGGTCGAC
AACAAAACCTTCAGCGTCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCCACCGTGAAGAT
CTTACAGTCGTCCTGCGACGGCGGGCGGCACTTCCCCCGACCATCCAGCTCC
TGTGCCTCGTCTCTGGGTACACCCAGGGACTATCAACATCACCTGGCTGGAG
GACGGGCAGGTATGGACGTGGACTTGTCCACCGCCTTACCACGCAGGAGG
GTGAGCTGGCCTCCACACAAAGCGAGCTCACCTCAGCCAGAAGCACTGGCT
GTCAGACCGCACCTACACCTGCCAGGTCACCTATCAAGGTCACACCTTTGAGG
ACAGCACCAAGAAGTGTGCAGATTCCAACCCGAGAGGGGTGAGCGCCTACCT
AAGCCGGCCAGCCGTTTCGACCTGTTTCATCCGCAAGTCGCCACGATCACCT
GTCTGGTGGTGGACCTGGCACCCAGCAAGGGGACCGTGAACCTGACCTGGTC
CCGGGCCAGTGGGAAGCCTGTGAACCACTCCACCAGAAAGGAGGAGAAGCAG
CGCAATGGCACGTTAACCGTCACGTCCACCCTGCCGGTGGGCACCCGAGACTG
GATCGAGGGGGAGACCTACCAGTGCAGGGTGACCCACCCCACTGCCCAGG
GCCCTCATGCGGTCCACGACCAAGACCAGCGGCCCGCGTGCTGCCCGGAAG
TCTATGCGTTTGCAGCGCCGGAGTGGCCGGGAGCCGGGACAAGCGCACCT
CGCCTGCCTGATCCAGAACTTCATGCCTGAGGACATCTCGGTGCAGTGGCTGC
ACAACGAGGTGCAGCTCCCGACGCCCGGCACAGCACGACGCAGCCCCGCAA
GACCAAGGGCTCCGGCTTCTTCGTCTTCAGCCGCCTGGAGGTGACCAGGGCCG
AATGGGAGCAGAAAGATGAGTTCATCTGCCGTGCAGTCCATGAGGCAGCGAG
CCCCTCACAGACCGTCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGGTAAATGA

FIG. 18

SEQ ID NO:10

GACATCGAGCTGACCCAGAGCCCCAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGCG
ACAGAGTGTCCGTGACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGACACCAACGT
GGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTGAGCCTCTGCTGTTT
AGCGCCAGCTACAGATACACCGGCGTGCCCGACAGATTCACAGGCAGCG
GCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCAACGTGCAGAGCGAGGA
CCTGGCCGAGTACTTCTGCCAGCAGTACAACAGCTACCCCTGACCTTCG
GCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCGGCCATCTGTCT
TCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGT
GCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGA
TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT
ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTC
GCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

FIG. 19

SEQ ID NO:11

CAAGTCAAACCTGCAGCAGAGCGGTGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGTGGCAGCA
TGAAGCTGAGCTGCGTCGTGAGCGGCTTCACCTTCAGCAACTACTGGATGAAC
TGGGTCCGGCAGAGCCCCGAGAAGGGCCTGGAATGGATCGCCGAGATCCGGC
TGAAAAGCAACAACCTTCGGCCGGTACTACGCCGAGAGCGTGAAGGGCCGGTT
CACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAGCAGCGCCTACCTGCAGATGATCAAC
CTGCGGGCCGAGGACACCGGCATCTACTACTGCACCAGCTACGGCAACTACGT
GGGCCACTACTTCGACCACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACTGTCAGCAGC
G

FIG. 20

SEQ ID NO:12

GACATCGAGCTGACCCAGAGCCCCAAGTTCATGAGCACCAGCGTGGGGCGACA
GAGTGTCCGTGACCTGCAAGGCCAGCCAGAACGTGGACACCAACGTGGCCTG
GTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGAGCCCTGAGCCTCTGCTGTTTCAGCGCCAGCT
ACAGATACACCGGCGTGCCCCGACAGATTCACAGGCAGCGGCTCCGGCACCGA
CTTACCCTGACCATCAGCAACGTGCAGAGCGAGGACCTGGCCGAGTACTTCT
GCCAGCAGTACAACAGCTACCCCCTGACCTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGGA
AATCAAGC

FIG. 21

SEQ ID NO:13

CTAGCACACAGAGCCCATCCGTCTTCCCCTTGACCCGCTGCTGCAAAAAC
ATTCCCTCCAATGCCACCTCCGTGACTCTGGGCTGCCTGGCCACGGGCTA
CTTCCCGGAGCCGGTGTGGTACCTGGGACACAGGCTCCCTCAACGGG
ACAACTATGACCTTACCAGCCACCACCCTCACGCTCTCTGGTCACTATGC
CACCATCAGCTTGCTGACCGTCTCGGGTGCCTGGGCCAAGCAGATGTTCA
CCTGCCGTGTGGCACACACTCCATCGTCCACAGACTGGGTCGACAACAAA
ACCTTCAGCG

FIG. 22A

SEQ ID NO:14

TCTGCTCCAGGGACTTCACCCCGCCCACCGTGAAGATCTTACAGTCGTCC
TGCGACGGCGGGCGGGCACTTCCCCCGACCATCCAGCTCCTGTGCCTCG
TCTCTGGGTACACCCAGGGACTATCAACATCACCTGGCTGGAGGACGG
GCAGGTCATGGACGTGGACTTGTCACCCGCTTACCACGCAGGAGGGT
GAGCTGGCCTCCACACAAAGCGAGCTCACCTCAGCCAGAAGCACTGGC
TGTCAGACCGCACCTACACCTGCCAGGTCACCTATCAAGGTCACACCTTT
GAGGACAGCACCAAGAAGTGTGCAG

FIG. 22B

SEQ ID NO:15

ATTCCAACCCGAGAGGGGTGAGCGCCTACCTAAGCCGGCCCAGCCCGTT
CGACCTGTTTCATCCGCAAGTCGCCACGATCACCTGTCTGGTGGTGGACC
TGGCACCCAGCAAGGGGACCGTGAACCTGACCTGGTCCCGGGCCAGTGG
GAAGCCTGTGAACCACTCCACCAGAAAGGAGGAGAAGCAGCGCAATGGC
ACGTTAACCGTCACGTCCACCCTGCCGGTGGGCACCCGAGACTGGATCG
AGGGGGAGACCTACCAGTGCAGGGTGACCCACCCCCACCTGCCAGGGC
CCTCATGCGGTCCACGACCAAGACCAGCG

FIG. 22C

SEQ ID NO:16

GCCCGCGTGCTGCCCGGAAGTCTATGCGTTTGCGACGCCGGAGTGGCC
GGGGAGCCGGGACAAGCGCACCCCTCGCCTGCCTGATCCAGAACTTCATG
CCTGAGGACATCTCGGTGCAGTGGCTGCACAACGAGGTGCAGCTCCCGG
ACGCCCGGCACAGCACGACGACCCCGCAAGACCAAGGGCTCCGGCTT
CTTCGTCTTCAGCCGCCTGGAGGTGACCAGGGCCGAATGGGAGCAGAAA
GATGAGTTCATCTGCCGTGCAGTCCATGAGGCAGCGAGCCCTCACAGA
CCGTCCAGCGAGCGGTGTCTGTAAATCCCGGTAATGA

FIG. 22D

SEQ ID NO:17

**GTACGGTGGCGGCGCCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC
CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT
AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA
GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA
AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA
AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG**

FIG. 23

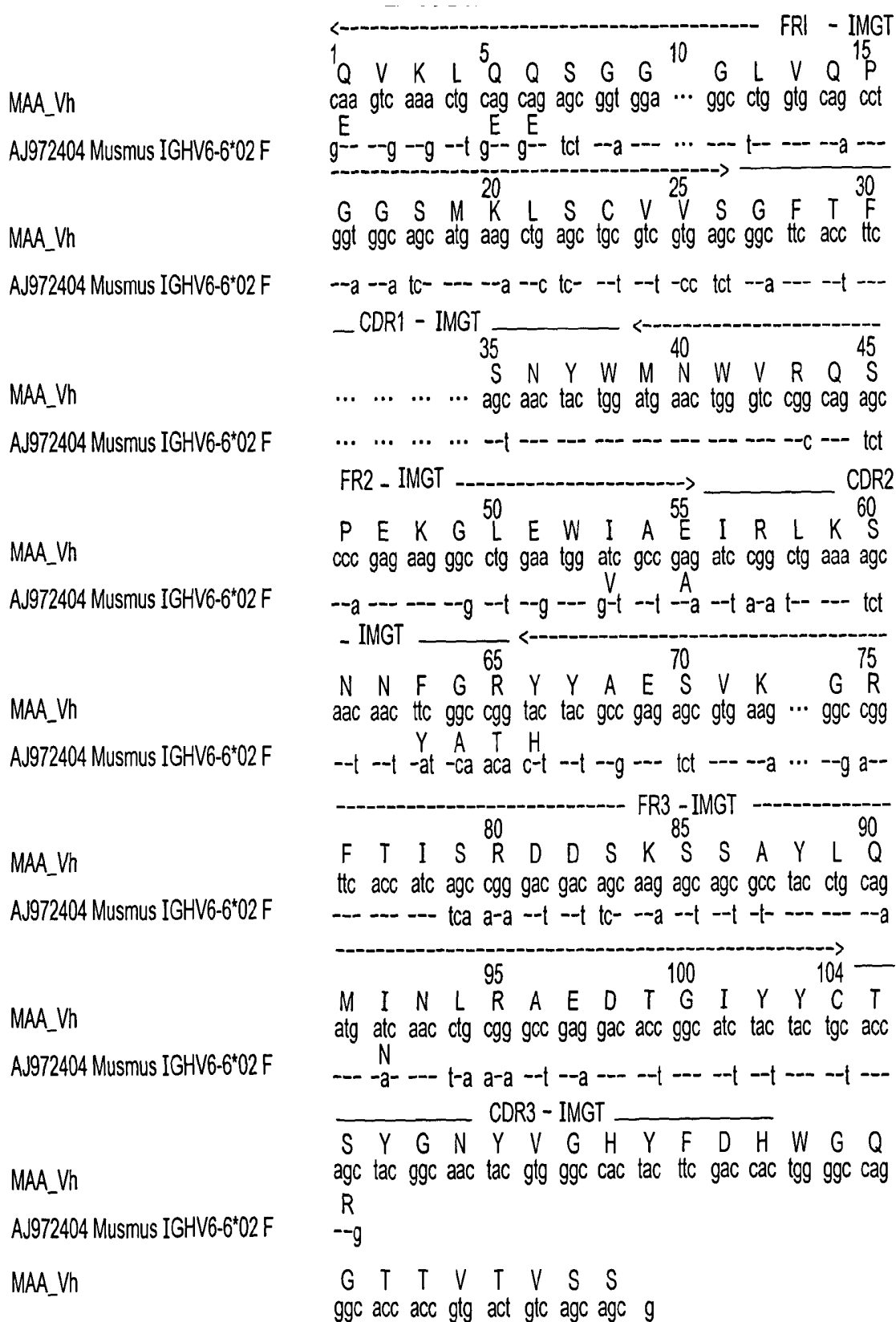


FIG. 24


```

<----- FRI - IMGT ----->
1      5      10      15
D I E L T Q S P K F M S T S V
gac atc gag ctg acc cag agc ccc aag ttc atg agc acc agc gtg
--- -t -t- a- --- --- tct -aa -a --- --- tc- --a tca --a
----->
      20      25      30
C D R V S V T C K A S Q N V
ggc gac aga gtg tcc gtg acc tgc aag gcc agc cag aac gtg ...
--a --- -g -c ag- -c --- --- --- -t --- -t --- ...
--- CDR1 - IMGT -----<-----
      35      40      45
... .. D T N V A W Y Q Q K
... .. gac acc aac gtg gcc tgg tat cag cag aag
... .. G
... .. -gt -t -t --a --- --- --a --- --a
FR2 - IMGT -----> ----- CDR2
      50      55      60
P G Q S P E P L L F S A
ccc ggc cag agc cct gag cct ctg ctg ttc agc gcc ... ..
--a -g -a tct --- a-a g-a --- a-t -a- tcg --a ... ..
-IMGT -----<-----
      65      70      75
... .. S Y R Y T G V P D R
... .. agc tac aga tac acc gcc gtg ccc ... gac aga
... .. S
... .. tc- --- c-g --- -gt --a --c -t ... -t c-c
----- FR3 - IMGT -----
      80      85      90
F T G S G ... .. S G T D F T L T
ttc aca ggc agc ggc ... .. tcc ggc acc gac ttc acc ctg acc
--- --- -t --a ... .. -t --q --a -t --- -t --C ---
----->
      95      100      104
I S N V Q S E D L A E Y F C Q
atc agc aac gtg cag agc gag gac ctg gcc gag tac ttc tgc cag
--- --- -t --- --- tct --a --- t- --a --- -t --- -t ---
----- CDR3 - IMGT -----
      Q Y N S Y P L T F G G G T K L
cag tac aac agc tac ccc ctg acc ttc gcc gga gcc acc aag ctg
--a -t --- --- -t -t --
E I K
gaa atc aag c
Y15976 Musmus IGKV6-15*01 F

```

FIG. 25