

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 495**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2010 PCT/CN2010/000232**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097012**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2010 E 10745796 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2401300**

54 Título: Anticuerpos anti-C ϵ mX capaces de unirse a mIgE humana sobre linfocitos B

30 Prioridad:

25.02.2009 US 155224 P

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

26.04.2018

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)
128, Academia Road, Section 2, Nankang
Taipei 11529, TW**

72 Inventor/es:

**CHANG, TSE WEN;
CHEN, JIUN-BO;
WU, PHEIDIAS, C. y
HUNG, ALFUR, F.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 665 495 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-C ϵ mX capaces de unirse a mIgE humana sobre linfocitos B

Antecedentes de la invención

5 La IgE representa un papel fundamental en la mediación de reacciones de hipersensibilidad tipo I que son responsables de provocar enfermedades alérgicas, incluyendo asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica y otras. Las reacciones alérgicas son las respuestas del sistema inmunitario a sustancias ambientales dañinas, tales como ácaros del polvo, pólenes de árboles y gramíneas, ciertos alimentos y fármacos y picaduras de abejas y hormigas rojas. En estas reacciones, la unión de un alérgeno a IgE sobre la superficie de basófilos y mastocitos
10 provoca la reticulación de IgE y la agregación de los receptores subyacentes de IgE.Fc, los receptores de IgE.Fc de tipo I o Fc ϵ RI. Esta agregación de receptores activa posteriormente la ruta de señalización que conduce a la exocitosis de gránulos y la liberación de mediadores farmacológicos, tales como histamina, leucotrienos, triptasa, citocinas y quimiocinas. La liberación de esos mediadores de los mastocitos y los basófilos provoca las diversas manifestaciones patológicas de la alergia.

15 Se han desarrollado anticuerpos anti-IgE que se unen a IgE libre en la sangre y en fluido intersticial y a mIgE sobre células B, pero no a IgE unida por Fc ϵ RI sobre basófilos y mastocitos, para tratar enfermedades alérgicas mediadas por IgE. El tratamiento con un anticuerpo anti-IgE humanizado, omalizumab (nombre comercial Xolair), ha mostrado múltiples efectos farmacológicos en la atenuación de la hipersensibilidad de tipo I en diversas indicaciones alérgicas.
20 El anticuerpo se une a IgE con alta afinidad en un sitio en el dominio CH3 de Fc que se solapa con el sitio de unión de Fc ϵ RI. De ahí que la terapia se base en la unión del anticuerpo a IgE libre y a mIgE sobre linfoblastos B y células B de memoria, lo que conduce a la reducción del nivel de IgE libre global en sangre y fluido intersticial.

25 La unión de anti-IgE a IgE libre evita adicionalmente la unión de IgE a Fc ϵ RI sobre la superficie de basófilos y mastocitos. Como el Fc ϵ RI no ocupado por IgE es inestable y posteriormente se internaliza y se degrada, el agotamiento de IgE libre con unión a anti-IgE también regula a la baja gradualmente Fc ϵ RI sobre basófilos y mastocitos. Se ha encontrado una evidencia de otros efectos de la terapia con anticuerpos, incluyendo la neutralización de actividades citocinérgicas, la atenuación de la actividad inflamatoria global y posiblemente el barrido de alérgenos a través de la acumulación de complejos inmunitarios de IgE-anti-IgE.

30 Uno de los inventores (T. W. Chang) de esta invención descubrió que además del sitio antigénico sobre CH3 de IgE al que se une el omalizumab, existe otro sitio antigénico, denominado C ϵ mX, sobre mIgE humana para la elección como diana de linfocitos B que expresan mIgE. C ϵ mX es un segmento de 52 aminoácidos situado entre el dominio CH4 y el segmento de anclaje a la membrana C-terminal de una cadena ϵ unida a la membrana (m ϵ) humana. Se ha
35 mostrado que en la mayoría de los sujetos humanos estudiados, la m ϵ sin C ϵ mX (m ϵ _S) supone proporciones mínimas, mientras que la cadena m ϵ con C ϵ mX (m ϵ _L) se expresa predominantemente. Los ARNm para la cadena ϵ de IgE secretada libre y para m ϵ _S y m ϵ _L de mIgE se derivan todos del empalme alternativo del transcrito de ARN de ϵ . Las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de C ϵ mX son únicas en las bases de datos de proteínas enteras y ADN. Por lo tanto, C ϵ mX proporciona un sitio antigénico único para elegir como diana mIgE y las células B que
40 expresan mIgE.

45 El grupo de investigación de Chang presentó previamente el desarrollo de varios anticuerpos monoclonales de ratón específicos para C ϵ mX, incluyendo a20, que se pueden unir a proteínas recombinantes que contienen un segmento de C ϵ mX y a células de la línea celular SKO-007, que era una línea celular derivada de mieloma humano que expresaba mIgE humano, y a células de una línea celular CHO, que era transfectada con el gen correspondiente al segmento procedente del dominio CH2 a través del extremo citoplásmico de M ϵ _L (m ϵ _{L(CH2-CM)}; CM: citoplasma). Se encontró que el anticuerpo monoclonal a20 y todos los anticuerpos desarrollados previamente se unen a una región peptídica de 8 aa, RADWPGPP, residuos n° 45-52, en el extremo C-terminal del dominio C ϵ mX de 52 aa.

50 El documento US20090010924 divulga anticuerpos anti-IgE apoptóticos, un ácido nucleico que codifica los mismos, composiciones terapéuticas de los mismos y su uso en el tratamiento de trastornos mediados por IgE. *Chen H. Y. 2002* divulga un estudio diseñado para evaluar los efectos de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos para C ϵ mX para elegir como diana células B que expresan IgE y disminuir la producción de IgE.

Sumario de la invención

55 Esta invención trata del desarrollo y la identificación de anticuerpos que son específicos para el dominio C ϵ mX de mIgE humana y que se pueden unir a mIgE sobre linfocitos B humanos.

También trata de la utilidad de estos anticuerpos para tratar enfermedades alérgicas y otras que están mediadas por IgE.
60

Al estudiar el anticuerpo monoclonal anti-C ϵ mX a20, que fue desarrollado por el grupo de investigación de Chang, se encontró que a20 tiene buena unión a líneas celulares transfectadas con el gen m ϵ _{L(CH2-CM)}, tales como la línea

celular CHO o la línea celular NS0, que no expresan Ig α (CD79a), Ig β (CD79b), CD21, CD19, CD81 y otras proteínas asociadas con el receptor de células B (BCR). Sin embargo, se encontró que a20 se unía escasamente a líneas celulares transfectadas con el gen m $\epsilon_{L(CH2-CM)}$ que expresan Ig α , Ig β y otras proteínas asociadas a BCR, tales como la línea celular Ramos. Se estableció como hipótesis que el epítipo antigénico sobre C ϵ mX reconocido por a20 puede ser bloqueado por cierta(s) proteína(s) asociada(s) al BCR. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal a20 y sus versiones quiméricas o humanizadas no serían adecuados para el uso en pacientes humanos *in vivo* con el propósito de elegir como diana linfoblastos y células de memoria B que expresan mIgE.

Si el epítipo peptídico RADWPGPP es el único epítipo para inducir respuesta de anticuerpos, los anticuerpos monoclonales generados a partir de metodología de hibridomas usando ratones que están inmunizados con proteínas que contienen C ϵ mX humano serían todos específicos para esta región peptídica. Sin embargo, si el epítipo es un epítipo dominante, pero no el único epítipo inmunogénico, todavía se desarrollarían anticuerpos monoclonales específicos para otros epítipos antigénicos sobre C ϵ mX. Es posible que exista un epítipo o epítipos sobre C ϵ mX que sean bloqueados por proteínas asociadas con el BCR con respecto a la unión a anticuerpos. Si es así, todavía se puede desarrollar un anticuerpo que se una a IgE sobre células B y que se pueda usar para elegir como diana esas células B.

En los siguientes ejemplos, se ha mostrado satisfactoriamente que aunque RADWPGPP es un epítipo dominante, no es el único epítipo inmunogénico y antigénico sobre C ϵ mX. Por otra parte, se han descubierto anticuerpos monoclonales, 4B12 y 26H2, que se unen a C ϵ mX sobre epítipos antigénicos no situados en la región de RADWPGPP. Esos anticuerpos monoclonales no compiten con el anticuerpo a20 en la unión a C ϵ mX. Se unen a mIgE sobre células B mucho más fuertemente que a20 y son mucho más eficaces que a20 para provocar citolisis y apoptosis dependientes de anticuerpos de células que expresan mIgE.

Los ejemplos indican que los anticuerpos monoclonales, tales como 4B12 y 26H2, se pueden unir a mIgE sobre linfocitos B humanos y son adecuados para el uso para elegir como diana linfoblastos B y células B de memoria que expresan mIgE para la regulación a la baja de la síntesis de IgE. Los anticuerpos en formas quiméricas o humanizadas serán útiles para el uso en pacientes afectados por enfermedades alérgicas mediadas por IgE, tales como asma alérgica, rinitis alérgica y dermatitis atópica. Puesto que se ha mostrado que la neutralización de IgE mediante anti-IgE trata eficazmente la urticaria inducida por frío, la urticaria crónica, la urticaria colinérgica, la rinosinusitis crónica, la mastocitosis sistémica, la mastocitosis cutánea, la aspergilosis broncopulmonar alérgica, el angioedema idiopático recurrente y la cistitis intersticial, o trastornos gastrointestinales asociados a eosinófilos, los anticuerpos, tales como 4B12 y 26H2, también se pueden aplicar para tratar esas enfermedades diversas.

Los ejemplos sugieren además la utilidad potencial de los péptidos reconocidos por 4B12 y 26H2 al inducir una respuesta inmunitaria contra C ϵ mX y de ahí células B que expresan mIgE. Los péptidos y sus análogos con propiedades antigénicas similares, es decir, con actividad de unión a anticuerpos anti-C ϵ mX, tales como 4B12 y 26H2, se pueden usar individualmente o en combinación en construcciones moleculares que también contienen restos que pueden inducir la cooperación de células T. Estas construcciones también pueden inducir una inmunización activa contra células B que expresan mIgE y así alcanzar los efectos de regulación a la baja de la síntesis de IgE total.

Ejemplo 1: Nuevos anticuerpos monoclonales anti-C ϵ mX que se unen a sitios antigénicos distintos a RADWPGPP

Para inducir una respuesta inmunitaria anti-C ϵ mX, ratones BALB/c se inmunizaron dos veces subcutáneamente con 50 μ g de proteínas recombinantes de mIgE.Fc_L solubilizadas en n-undecil- β -d-maltopiranosido (UDM; Anatrace) que se emulsionaron en adyuvante TiterMax Gold (Sigma-Aldrich) según las sugerencias del fabricante a intervalos de 2 semanas. Se evitó el protocolo de hiperinmunización, de modo que los ratones no produjeran anticuerpos solamente hacia el epítipo RADWPGPP dominante. Una dosis de refuerzo final se aportó intraperitonealmente con 0,1 mg de proteínas recombinantes de mIgE.Fc_L solubilizadas en UDM sin adyuvante. Un día antes de la fusión, células NS0 se sembraron en medio DMEM (Invitrogen) reciente complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Invitrogen) termoinactivado y 1% de mezcla de penicilina-estreptomicina (100x solución Pen-Strep; Invitrogen) a una densidad celular de 5×10^5 células/ml. Tres días después de la dosis de refuerzo final, los esplenocitos procedentes de dos ratones inmunizados se recogieron y se lavaron con medio DMEM libre de suero. Se recogieron 5×10^7 células NS0 y se lavaron con medio DMEM libre de suero dos veces. Después del lavado, los esplenocitos y las células NS0 se fusionaron al añadir 1 ml de polietilenglicol 1500 (PEG 1500, Roche Applied Science) al 50% precalentado mientras las células se agitaban continuamente con la punta de la pipeta a lo largo de 1 min, agitando las células durante 1 min más, añadiendo 2 ml de DMEM libre de suero precalentado a lo largo de 2 min y finalmente añadiendo 8 ml de DMEM libre de suero a lo largo de 2 min. Después de la centrifugación a 200xg durante 10 min, las células fusionadas se resuspendieron con 600 ml de medio HAT [medio DMEM complementado con 2% de mezcla de hipoxantina-aminoptericina-timidina (50x solución HAT; Invitrogen), 10% de BM-Condimed H1 (Roche Applied Science), 10% de FBS termoinactivado y 1% de mezcla de penicilina-estreptomicina] y se distribuyeron en 30 placas de cultivo de 96 pocillos en 200 μ l/pocillo. A los 3 días, se añadieron a cada pocillo 100 μ l de medio HAT. Los días 7 y 10, el medio se renovó al aspirar la mitad del volumen de cada pocillo y reemplazar por medio HAT. A

los 14 días, se usaron sobrenadantes de hibridoma para cribar mAbs anti-C ϵ mX con respecto a la unión a proteínas de mIgE.Fc_L o mIgE.Fc_S solubilizadas con UDM mediante ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA).

5 Para cribar hibridomas que secretan mAbs anti-C ϵ mX mediante ELISA, proteínas de mIgE.Fc_L o mIgE.Fc_S solubilizadas con UDM purificadas se revistieron sobre placas MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc) en 50 ng/pocillo en NaCO₃ 0,1 M (pH 9,6) a 4°C durante la noche. Los pocillos revestidos se bloquearon mediante 200 μ l/pocillo de BSA al 1% en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%, seguido por la adición de 100 μ l de sobrenadantes de hibridoma a los pocillos. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Todos los pocillos se aspiraron y se lavaron seis veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%. Las placas se incubaron con una dilución 1:10.000 de anticuerpo caprino anti-IgG de ratón conjugado a HRP (Chemicon) durante 1 hora (100 μ l/pocillo). A continuación, todos los pocillos se aspiraron y se lavaron seis veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%. Finalmente, los pocillos se desarrollaron mediante 50 μ l/pocillo de solución de sustrato de tetrametilbencidina (TMB) (SureBlue™, KPL) y la reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l/pocillo de HCl 1 N. La absorbancia se midió a OD₄₅₀ en un lector de ELISA. De >4000 clones de hibridoma cribados de dos fusiones, 17 clones mostraban especificidad para mIgE.Fc_L en lugar de mIgE.Fc_S solubilizados con UDM según se determinaba mediante ELISA.

20 Para explorar la especificidad de mAbs anti-C ϵ mX para C ϵ mX, los diversos clones específicos para C ϵ mX se probaron a continuación con respecto a la reactividad con 3 péptidos sintéticos, que representan 3 segmentos consecutivos de C ϵ mX, divididos por un residuo de C situado en el residuo n° 18 y un segmento de CHC en los residuos n° 39-41. Específicamente, el péptido P1 contiene los últimos 4 residuos de aminoácido de CH4 de m ϵ y los primeros 17 residuos de aminoácido (n° 1-17), a saber, GLAGSAQSQRAPDRVL, de C ϵ mX; el péptido P2 contiene 20 residuos de aminoácido n° 19-38, a saber, HSGQQQLPRAAGGSVPHPR, de C ϵ mX; el péptido P3 contiene los 11 residuos de aminoácido terminales (n° 42-52), a saber, GAGRADWPGPP, de C ϵ mX y los 4 primeros residuos de aminoácido de la región *migs* consecutiva, a saber, la región extracelular N-terminal del péptido de anclaje a la membrana de la cadena m ϵ . Todos los péptidos se sintetizaron en Genomics Research Center, Academia Sinica (Taipéi, Taiwán). Los péptidos se reconstituyeron con PBS a una concentración de 10 mg/ml. Todos los péptidos se revistieron sobre placas MaxiSorp de 96 pocillos en 500 ng/pocillo en NaCO₃ 0,1 M (pH 9,6) a 4°C durante la noche. Los pocillos revestidos se bloquearon mediante 200 μ l/pocillo de BSA al 1% en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%, seguido por la adición de 100 μ l de 1 μ g/ml de mAbs anti-C ϵ mX a los pocillos. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas. Todos los pocillos se aspiraron y se lavaron seis veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%. Las placas se incubaron con una dilución 1:10.000 de anticuerpo caprino anti-IgG de ratón conjugado a HRP durante 1 hora. Después de seis veces con 200 μ l/pocillo de PBS con Tween-20 al 0,05%, se añadieron a los pocillos 50 μ l/pocillo de solución de sustrato de TMB. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μ l/pocillo de HCl 1 N. La absorbancia se midió a OD₄₅₀ en un detector de ELISA. De los muchos anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX preparados en los presentes experimentos, sólo 4B12 y 26H2 no reaccionan con péptido P3 que contiene RADWPGPP. 4B12 reaccionaba con péptido P1 y 26H2 con péptido P2. Todos los otros anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX reaccionaban con P3 (Figura 1). Así, RADWPGPP es en efecto un epítipo inmunogénico dominante. Sin embargo, no es el único epítipo inmunogénico.

Ejemplo 2: 4B12 y 26H2 se unen a mIgE sobre células B que expresan mIgE

Los presentes inventores también probaron la capacidad de diversos anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX para unirse a líneas celulares CHO y Ramos que se transfectaron con ADN recombinante que codifica bien m ϵ _{L(CH2-CM)} o bien m ϵ _{S(CH2-CM)}. Las dos líneas celulares CHO transfectadas producían respectivamente mIgE.Fc_L o mIgE.Fc_S, ninguno de los cuales forma un receptor de células B completo con correceptores tales como I α e I β , debido a que las células CHO no expresaban esas proteínas. Las dos líneas celulares Ramos transfectadas producían respectivamente mIgE.Fc_L o mIgE.Fc_S, ambos de los cuales forman complejos con sus correceptores naturales. Para investigar la unión de mAbs anti-C ϵ mX a C ϵ mX natural, células CHO o Ramos que expresan mIgE.Fc_L o mIgE.Fc_S se resuspendieron en tampón de FACS [PBS, 1% de FBS, 0,1% de azida sódica y EDTA 2 mM (pH 8,0)] a una densidad de 10⁷ células/ml. A continuación, se cultivaron 10⁶ células durante 30 min sobre hielo con 100 μ l de sobrenadantes de hibridoma, seguido por lavado con tampón de FACS. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante incubación durante 30 minutos sobre hielo con fragmento F(ab')₂ de conejo marcado con FITC específico para IgG de ratón (AbD Serotec), seguido por lavar dos veces con tampón de FACS antes del análisis. Se realizaron experimentos de citometría de flujo usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience) y se analizaron usando el software FCSEXPRESS (De Novo Software). Se encontró que ninguno de los anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX se unía a células CHO y Ramos que expresan mIgE.Fc_S. Se encontró que todos los anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX se unían a células CHO que expresan mIgE_L. Sin embargo, sólo 4B12 y 26H2 se podían unir a células Ramos que expresan mIgE.Fc_L, mientras que ninguno de los otros anticuerpos monoclonales específicos para C ϵ mX se podía unir a células Ramos que expresan mIgE.Fc_L (Figura 2).

Ejemplo 3: 4B12 y 26H2 inducen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra células B que expresan mIgE

Para investigar la actividad ADCC de mAbs anti-C ϵ mX quiméricos, se usaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) como células efectoras para elegir como diana células Ramos que expresan mlgE.Fc_L. Las PBMCs se purificaron de capas leucocitarias de donantes sanos (Taiwan Blood Service Foundation) mediante centrifugación sobre un gradiente de densidad de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) y se crioconservaron en FBS al 90%/DMSO al 10% (Hybri-Max™; Sigma-Aldrich). Antes del uso, las PBMCs se descongelaron y se cultivaron a 2×10^6 células/ml durante la noche en medio IMDM (Invitrogen) complementado con FBS terminoinactivada al 10% y 1% de mezcla de penicilina-estreptomicina. Para identificar células diana en un cocultivo con PBMCs, células Ramos que expresan mlgE.Fc_L se marcaron con 2,5 μ M de éster succinimidílico de diacetato de 5-(y -6)-carboxifluoresceína (CFDA, SE; Invitrogen) en BSA al 0,1%/PBS durante 10 min a 37°C. Después de tres lavados con medio RPMI frío (Invitrogen) que contenía 10% de FBS, las células se ajustaron hasta 10^5 células/ml. Para valoraciones de las relaciones efector-diana (E/T), 20.000 células marcadas en 200 μ l de medio RPMI completo se revistieron con anticuerpos a 1 μ g/ml durante 30 min a 37°C y a continuación se combinaron con un volumen igual de PBMCs a múltiples relaciones E/T desde 50 hasta 3,125. Para las valoraciones de anticuerpos, 20.000 células marcadas en 200 μ l de medio RPMI completo se opsonizaron con anticuerpo a diversas concentraciones (1000~0,01 ng/ml) durante 30 minutos a 37°C y a continuación se combinaron con PBMCs a una relación E/T de 25:1. Para medir la destrucción independiente de anticuerpos, las células diana marcadas también se incubaron con PBMCs en ausencia de anticuerpos a relaciones E/T dadas. Al final de la incubación de 24 horas, las células muertas se tiñeron con 2,5 μ g/ml de 7-aminoactinomicina (7-AAD; Invitrogen) durante 15 min sobre hielo. Las células se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCanto II. Las células diana vivas se definieron como el porcentaje de células positivas a CFSE/negativas a 7-AAD en análisis de gráficos de puntos. El porcentaje de células destruidas a una relación E/T dada se calculó según la siguiente fórmula: $100 \times [(\% \text{ de células diana vivas en el control independiente del anticuerpo} - \% \text{ de células diana vivas en la muestra}) / \% \text{ de células diana vivas en el control independiente del anticuerpo}]$. La actividad ADCC de c4B12, c26H2 y omalizumab se observó a múltiples relaciones E/T. A una relación E/T de 50, c4B12, c26H2 y omalizumab daban hasta 60% de lisis específica; en contraste, ca20 era menos activo y daba solamente 10~20% de lisis específica (Figura 3A). Además, se observó ADCC significativa cuando la concentración de c4B12 y c26H2 era superior a 0,01 μ g/ml. A la dosis máxima de 10 μ g/ml, la lisis específica de células diana por c4B12 y c26H2 variaba de 80% a 90%, mientras que ca20 daba hasta 50% de lisis específica (Figura 3B). El control positivo rituximab, que se dirigía a CD20, y omalizumab inducían eficazmente ADCC a múltiples relaciones E/T y de un modo sensible a la dosis. Así, se concluía que c4B12 y c26H2 son mAbs anti-C ϵ mX más potentes que ca20 en la mediación de ADCC y podían incorporar eficazmente células efectoras para elegir como diana células B que expresan mlgE, *in vivo*.

Ejemplo 4: Los mAbs anti-C ϵ mX quiméricos inducen la apoptosis de células Ramos que expresan IgE.Fc_L unido a la membrana

Para detectar la exposición a fosfatidilserina (PS), células Ramos que expresan mlgE.Fc_L (5×10^5 células/ml) se incubaron con mAbs anti-C ϵ mX quiméricos, omalizumab o anticuerpos de control a las concentraciones indicadas en medio de cultivo completo durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se trataron con fragmento F(ab')₂ caprino específico para el fragmento Fc de IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) a una concentración de 10 μ g/ml y se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 37°C. La detección de la exposición a fosfatidilserina (PS) se determinó al teñir las células en 200 μ l de tampón Annexin [10 mM de HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂] que contenía Annexin V (BioVision) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido 1/200, y 2,5 μ g/ml de yoduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich) durante 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II. Las células apoptóticas se definieron como el porcentaje de células positivas a Annexin V/negativas a PI en análisis de gráficos de puntos. Aproximadamente 80% de células Ramos que expresan mlgE.Fc_L moría a través de apoptosis al incrementar la concentración de c4B12, c26H2 o omalizumab, pero no ca20, con una inducción máxima a 1 μ g/ml (Figura 4A).

Para la detección de núcleos apoptóticos, células Ramos que expresan mlgE.Fc_L (5×10^5 células/ml) se incubaron con mAbs anti-C ϵ mX quiméricos, omalizumab o anticuerpos de control a una concentración de 1 μ g/ml en medio de cultivo completo durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se trataron con fragmento F(ab')₂ caprino específico para el fragmento Fc de IgG humana a una concentración final de 10 μ g/ml y se incubaron adicionalmente durante 48 horas a 37°C. Se incubaron 5×10^5 células en 0,5 ml de solución de yoduro de propidio (PI)/Triton (0,1% de citrato sódico, 0,1% de Triton X-100, 15 μ g/ml de PI y 100 μ g/ml de ARNasa A en PBS; todos de Sigma-Aldrich) durante una hora en la oscuridad sobre hielo. La fluorescencia del PI se determinó en un citómetro de flujo FACSCanto II. El contenido de ADN de intacto de núcleos se registró en una escala lineal. Los núcleos apoptóticos que contienen ADN hipodiploide que emiten fluorescencia en canales por debajo del pico de G₀/G₁ se enumeraron como un porcentaje de la población total. Se observó un incremento significativo en la población celular con ADN hipodiploide en células Ramos tratadas con c4B12, c26H2 u omalizumab que expresan mlgE.Fc_L (Figura 4B).

Para la detección de la escisión de caspasa 3 y poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP), células Ramos que expresan mlgE.Fc_L (5×10^5 células/ml) se incubaron con mAbs anti-C ϵ mX quiméricos, omalizumab o anticuerpos de control a una concentración de 1 μ g/ml en medio de cultivo completo durante 1 hora a 37°C. A continuación, las células se trataron con fragmento F(ab')₂ caprino específico para el fragmento Fc de IgG humana a una

concentración final de 10 µg/ml y se incubaron adicionalmente durante 24 horas a 37°C. 5×10^6 células se lavaron en PBS enfriada con hielo y se resuspendieron en 100 µl de tampón de lisis RIPA modificado [20 mM de Tris (pH 7,4), 150 mM de NaCl, 1% de Triton-X 100, 0,5% desoxicolato, 0,1% de dodecilsulfato sódico (SDS), 5 mM de EDTA e inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich)]. Los lisados se incubaron durante 20 min sobre hielo. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 16000xg y 4°C. Los sobrenadantes se transfirieron a un tubo de 1,5 ml reciente y se almacenaron a -80°C. La cantidad de proteína en cada lisado clarificado se cuantificó usando el ensayo Protein DC (Bio-Rad Laboratories) según las sugerencias del fabricante. Cada muestra se normalizó con respecto al contenido de proteína total y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) seguido por transferencia a membranas de PVDF (GE Healthcare). Se obtuvieron anticuerpos policlonales de conejo para caspasa-3 y PARP de Cell Signaling Technology y se usaron en diluciones 1:500. Se usó anticuerpo secundario caprino anti-IgG de conejo conjugado a HRP (Sigma-Aldrich) en diluciones 1:10.000. Las membranas se desarrollaron con un reactivo ECL (Immobilon™ Western; Millipore). La carga de proteína equivalente se verificó al sondear la transferencia con un anticuerpo para β-actina (Sigma-Aldrich). 24 horas después de que células Ramos que expresan mlgE.Fc_L se trataran mediante c4B12, c26H2 y omalizumab, en lugar de ca20, la escisión de caspasa-3 en fragmentos M_r de 19 y 17 kDa era evidente. Además, la escisión de PARP era detectable en células Ramos que expresan mlgE.Fc_L tratadas con c4B12, c26H2 y omalizumab usando un anticuerpo reconocido la PARP intacta de 116 kDa de M_r y el producto de escisión de 89 kDa de M_r (Figura 4C).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los tres péptidos sintéticos que representan los segmentos consecutivos de CεmX y las reactividades de diversos mAbs anti-CεmX con esos péptidos. Los residuos de aminoácido del dominio CεmX se muestran en negrita.

La Figura 2 muestra la unión de diversos mAbs anti-CεmX a líneas celulares CHO o Ramos que expresan mlgE.Fc_L o mlgE.Fc_S.

La Figura 3A muestra que c4B12 y c26H2 quiméricos inducen ADCC contra células Ramos que expresan mlgE.Fc_L a múltiples relaciones E/T. La Figura 3B muestra que c4B12 y c26H2 inducen ADCC contra células Ramos que expresan mlgE.Fc_L de un modo sensible a la dosis.

La Figura 4A muestra que la exposición a PS inducida por c4B12 y c26H2 quiméricos en células Ramos que expresan mlgE.Fc_L depende de la dosis. La Figura 4B muestra que se observaban núcleos apoptóticos en células Ramos que expresan mlgE.Fc_L tratadas con c4B12 y c26H2 quiméricos. La Figura 4C muestra que se observaba escisión de caspasa 3 y PARP en células Ramos que expresan mlgE.Fc_L tratadas con c4B12 y c26H2 quiméricos.

La Figura 5 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la V_L y la V_H de 4B12 de ratón parental, las plantillas KV2 y HV4 de la línea germinal humana elegidas V_L y V_H, respectivamente, y el 4B12 humanizado (hu4B12), marcado como "Sustitución" en los alineamientos. Así, hu4B12 tiene la misma afinidad de unión a proteínas recombinantes de CεmX y a células Ramos que expresan mlgE.Fc_L que 4B12 quimérico (c4B12).

35 REFERENCIAS

Documentos de patente relacionados

	US5.091.313 2/1992	Chang
	US5.254.671 10/1993	Chang
	US5.260.416 11/1993	Chang
40	US5.274.075 12/1993	Chang
	US5.292.867 3/1994	Chang
	US5.342.924 8/1994	Chang
	US2009/0010924A1	Wu

45 Otras referencias

Davis FM, Gossett LA, Chang TW (1991) An epitope on membrane-bound but not secreted IgE: implications in isotype-specific regulation. *Bio/Technology* 9: 53-56.

Peng C, Davis FM, Sun LK, Liou RS, Kim YW, Chang TW (1992) A new isoform of human membrane-bound IgE. *J Immunol* 148: 129-136.

Chen, H.Y., Liu, F.T., Hou, C.M.H., Huang, J.S.W., Sharma, B.B., and Chang, T.W. (2002) Monoclonal antibodies against CεmX domain in human membrane-bound IgE and their potential on targeting IgE-expressing B cells. *Int. Archives Allergy & Immunol.* 128, 315-324.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo específico para C ϵ mX o un fragmento del mismo, que es capaz de unirse a IgE unida a la membrana sobre linfocitos B humanos e incapaz de unirse al péptido RADWPGPP, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se une a GLAGGSAQSQRAPDRVL (SEQ ID N $^{\circ}$: 2).
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 3. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables de un anticuerpo monoclonal de ratón y regiones constantes de anticuerpos humanos.
4. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado que comprende esencialmente las regiones hipervariables de un anticuerpo monoclonal de ratón y las regiones de armazón y regiones constantes de anticuerpos humanos.
- 15 5. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
6. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el fragmento del mismo es Fab, F(ab')₂ o un Fv monocatenario.
- 20 7. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un región variable de la cadena pesada indicada como SEQ ID N $^{\circ}$: 8, una región variable indicada como SEQ ID N $^{\circ}$: 5 o ambas.
8. El anticuerpo según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende un región variable de la cadena pesada indicada como SEQ ID N $^{\circ}$: 10, una región variable de la cadena ligera indicada como SEQ ID N $^{\circ}$: 7 o ambas.
- 25 9. Un inmunógeno que consiste en GLAGGSAQSQRAPDRVL (SEQ ID N $^{\circ}$: 2) para el uso en la inducción de una respuesta inmunitaria en pacientes *in vivo*.
10. Un anticuerpo o un fragmento del mismo para el uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE, en donde el anticuerpo se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 30 11. El anticuerpo o fragmento del mismo para el uso según la reivindicación 10, en donde la enfermedad mediada por IgE es asma alérgica, rinitis alérgica o dermatitis atópica.
- 35 12. El anticuerpo o fragmento del mismo para el uso según la reivindicación 10, en donde la enfermedad mediada por IgE es urticaria inducida por frío, urticarial crónica, urticaria colinérgica, rinosinusitis crónica, mastocitosis sistémica, mastocitosis cutánea, aspergilosis broncopulmonar alérgica, angioedema idiopático recurrente y cistitis intersticial, o trastornos gastrointestinales asociados con eosinófilos.

FIG. 1

	CH4	C _α mX	m _{ig} s
	SVNPGLAGGSAQSQRAPDRVLC HSGQQQLPRAAGGVSVP HRC HCGAGRADWP GPPPELDV		
P1	SVNPGLAGGSAQSQRAPDRVL		
P2	HSGQQQLPRAAGGVSVP HPR		
P3	GAGRADWP GPPPELDV		
	5H2	5H11	6H12
P1	+	+	+
P2	+	+	+
P3	+	+	+
mIgE.Fc _L	+	+	+
mIgE.Fc _S	+	+	+
IgE	+	+	+
	1G2	3A6	3H11
	1A8	18A11	4B12
	23B8	26H2	

FIG. 2

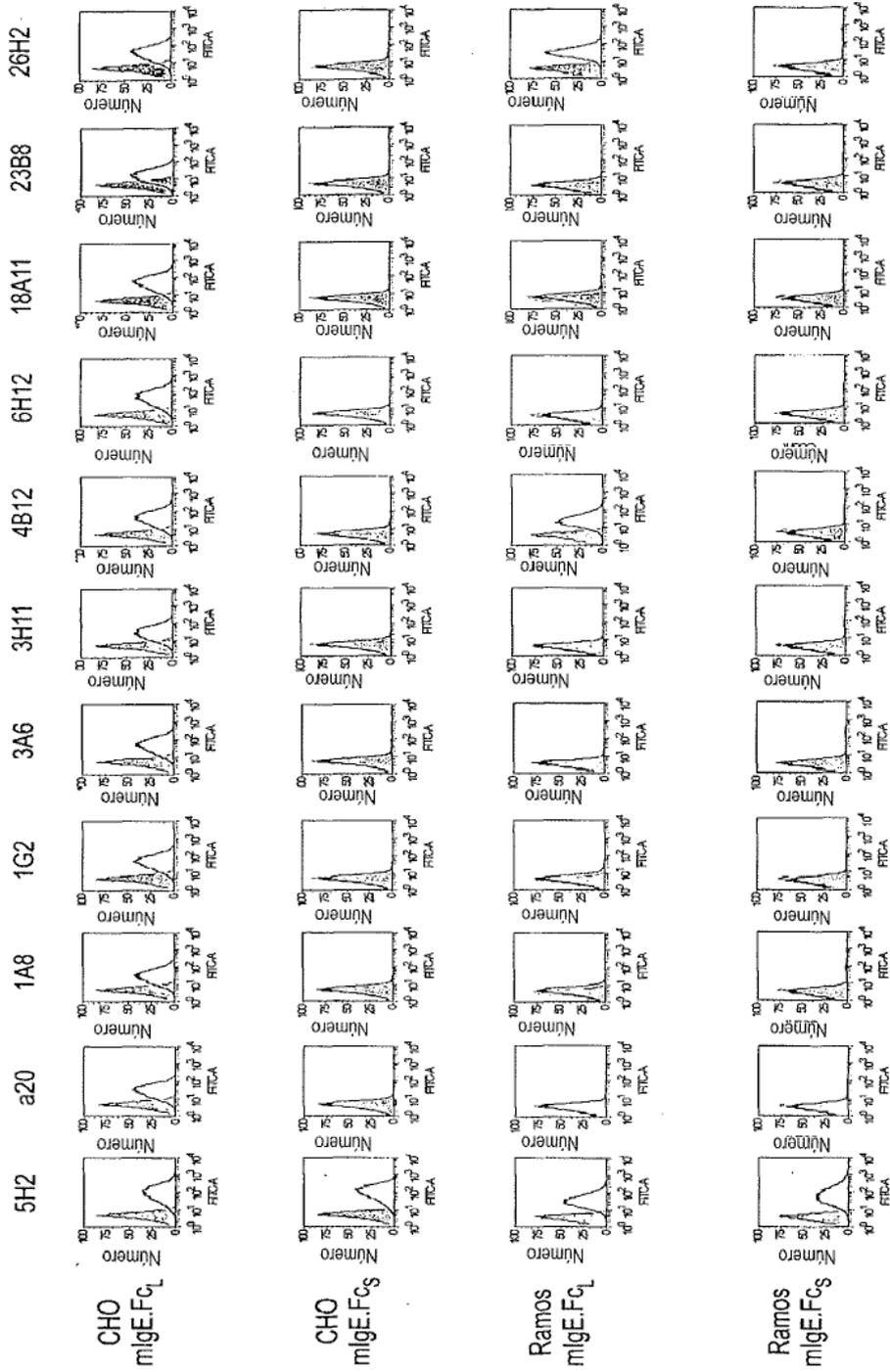


FIG. 3A

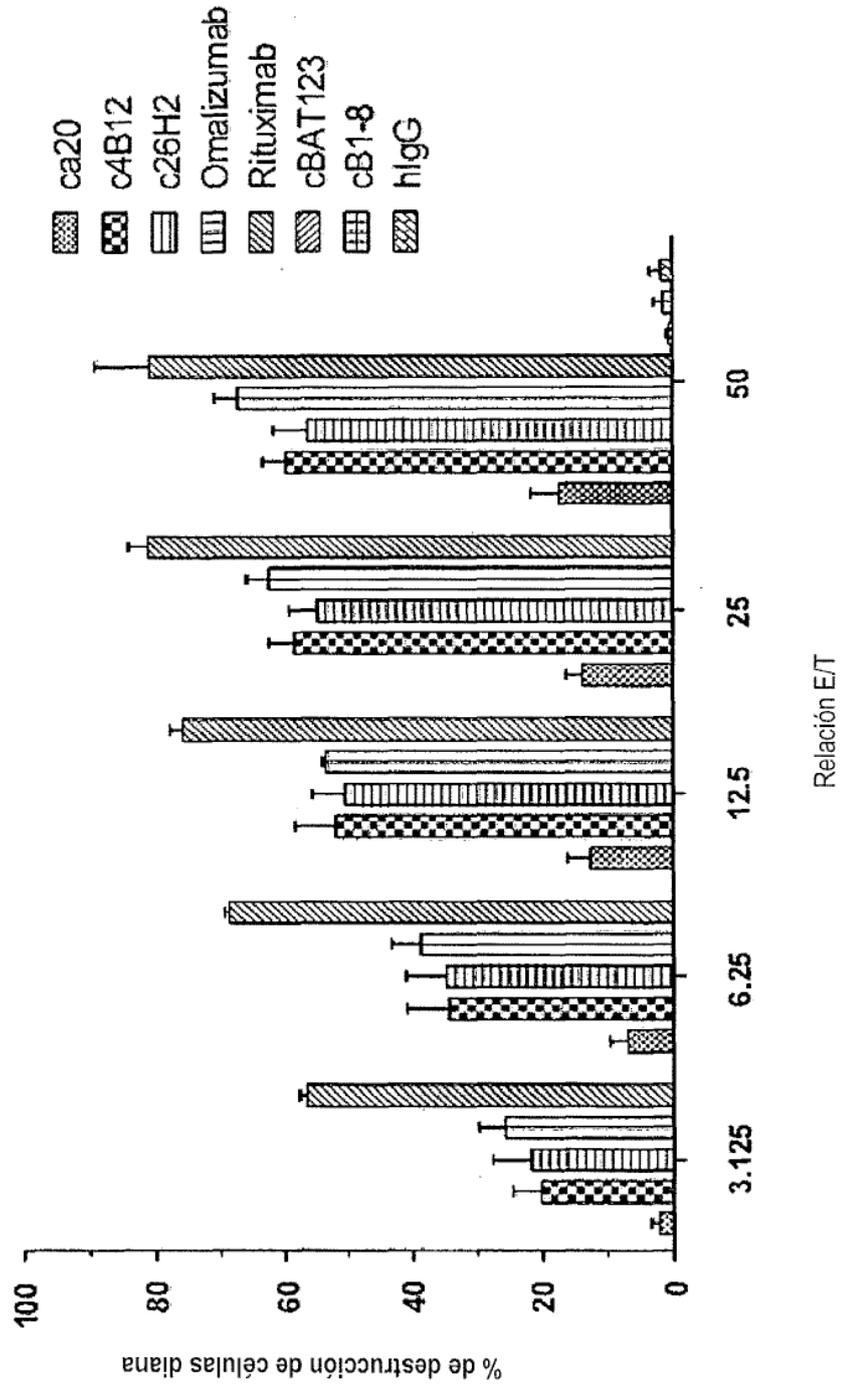


FIG. 3B

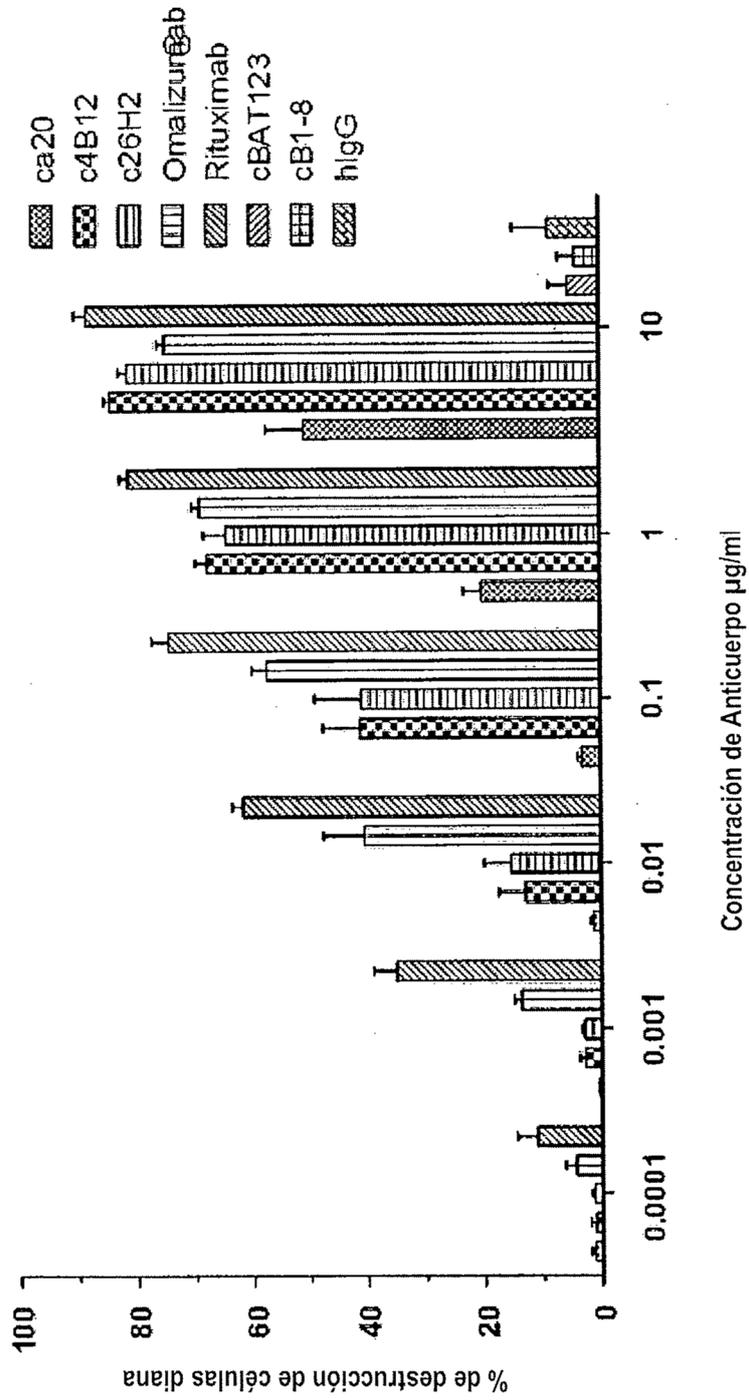


FIG. 4A

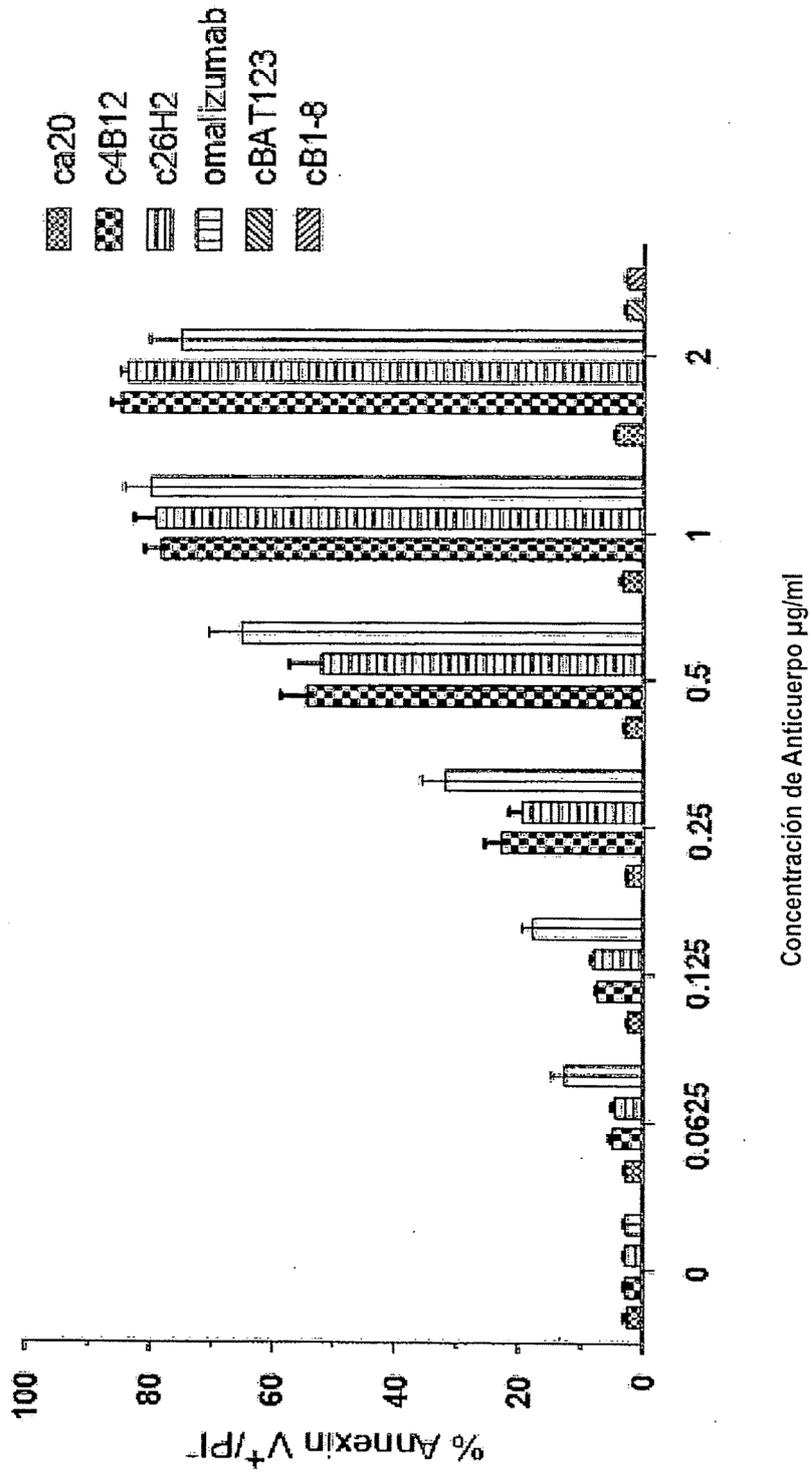


FIG. 4B

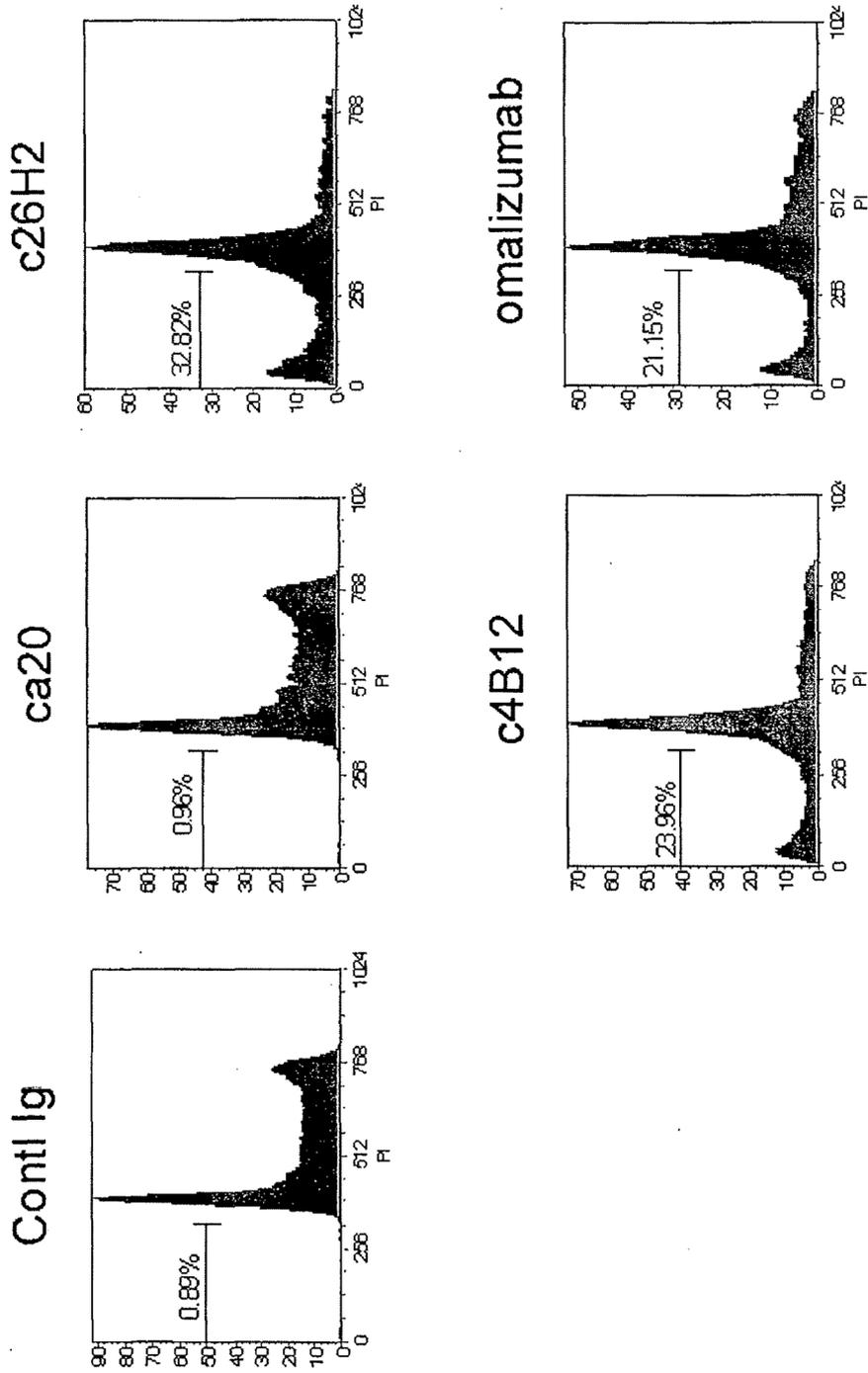


FIG. 4C

