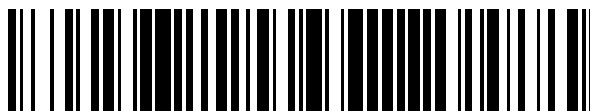


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 957**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/10 (2006.01)

A61K 39/40 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/US2015/023715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153685**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15772977 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3126385**

54 Título: **Anticuerpos de tos ferina humanizados y usos de los mismos**

30 Prioridad:

31.03.2014 US 201461973141 P

05.09.2014 US 201462046403 P

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

24.04.2020

73 Titular/es:

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (50.0%)

201 West 7th Street

Austin, TX 78701, US y

SYNTHETIC BIOLOGICS INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MAYNARD, JENNIFER;

NGUYEN, ANNALEE;

PADLAN, EDUARDO y

WAGNER, ELLEN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 755 957 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 tos ferina humanizados y usos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en parte, a anticuerpos humanizados que se unen a la proteína de la toxina pertussis y su uso como agentes terapéuticos. En particular, la presente invención está dirigida, en parte, a anticuerpos humanizados derivados del anticuerpo murino 1B7 que se unen a la proteína de la toxina pertussis.

10

ANTECEDENTES

Bordetella pertussis (B. pertussis) es una bacteria gramnegativa que infecta el tracto respiratorio superior, causando tos violenta e incontrolable. Según la Organización Mundial de la Salud, la infección por B. pertussis causa una estimación de 300.000 muertes en todo el mundo cada año, principalmente entre bebés de corta edad no vacunados. Los bebés con tos ferina a menudo requieren hospitalización en unidades de cuidados intensivos pediátricos, y sus tratamientos con frecuencia implican ventilación mecánica. La tos ferina en los adultos generalmente conduce a una tos crónica denominada "tos de 100 días". La incidencia de tos ferina está aumentando debido a la exposición de individuos no vacunados y no vacunados, incluidos los bebés que aún no están completamente vacunados, los individuos cuya inmunidad ha disminuido con el tiempo, y los portadores asintomáticos.

Los informes de noticias recientes en Estados Unidos indican que la vacuna contra la tos ferina introducida en la década de 1990 no proporciona protección a largo plazo. No existe un tratamiento aprobado para la tos ferina. Los tratamientos con antibióticos no tienen un efecto importante en el curso de la tos ferina, porque si bien el tratamiento puede eliminar la bacteria B. pertussis del tracto respiratorio, no neutraliza la proteína de la toxina pertussis. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de terapias más eficaces contra la tos ferina.

Además, en el mundo en desarrollo, el acceso a la vacuna contra la tos ferina existente, aunque deficiente, es inconsistente y a menudo difícil.

30

Los anticuerpos de origen natural son proteínas multiméricas que contienen cuatro cadenas de polipéptidos. Dos de las cadenas de polipéptidos se denominan cadenas pesadas (cadenas H), y dos de las cadenas de polipéptidos se denominan cadenas ligeras (cadenas L). Las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina están conectadas por un enlace disulfuro intercatenario. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina están conectadas por enlaces disulfuro intercatenarios. Una cadena ligera consiste en una región variable (V_L) y una región constante (C_L). La cadena pesada consiste en una región variable (V_H) y al menos tres regiones constantes (CH₁, CH₂ y CH₃). Las regiones variables determinan la especificidad del anticuerpo. Cada región variable comprende tres regiones hipervariables también conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR) flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) relativamente conservadas. Las tres CDR, denominadas CDR₁, CDR₂, y CDR₃, contribuyen a la especificidad de unión del anticuerpo. Los anticuerpos de origen natural se han utilizado como material de partida para anticuerpos modificados, tales como los anticuerpos humanizados.

Se han desarrollado anticuerpos que se unen a la proteína de la toxina pertussis, pero la eficacia de estos anticuerpos en pacientes es mínima o poco clara. Sato & Sato (Infection and Immunity 1990, 58(10):3369-3374) divulgan anticuerpos de ratón monoclonales protectores contra la toxina pertussis, incluyendo anticuerpos 1B7 y 11E6. El documento US 2012/244144 A1 divulga una versión humanizada del anticuerpo 1B7.

Sigue existiendo la necesidad de anticuerpos mejorados contra la proteína de la toxina pertussis con una eficacia aumentada y efectos secundarios reducidos a utilizar como agentes terapéuticos.

50

RESUMEN

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Por consiguiente, en diversos aspectos, la presente invención se refiere a uno o más anticuerpos humanizados que se unen y/o neutralizan una proteína de la toxina pertussis y los usos de la misma en el tratamiento o prevención de la tos ferina.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo 1B7 humanizado que se une a una proteína de toxina pertussis. El anticuerpo 1B7 humanizado incluye una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.

60

En diversas realizaciones, los anticuerpos 1B7 humanizados muestran propiedades mejoradas. En una realización, el anticuerpo 1B7 humanizado se une a la proteína de la toxina pertussis con una K_D de menos de aproximadamente 3 nM, o aproximadamente 2 nM, o aproximadamente 1 nM, o aproximadamente 0,5 nM.

5 En diversas realizaciones, la presente invención también proporciona ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped y métodos para producir los anticuerpos 1B7 humanizados. La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos 1B7 humanizados.

10 En un aspecto, la invención implica el anticuerpo 1B7 humanizado para su uso en el tratamiento de un paciente con Bordetella pertussis, que comprende administrar al paciente el anticuerpo 1B7 humanizado o composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo. En una realización, el anticuerpo 1B7 humanizado y un anticuerpo 11E6 humanizado se administran conjuntamente al paciente produciendo efectos sinérgicos. En otra realización, el método incluye administrar al paciente el anticuerpo 1B7 humanizado junto con agentes antimicrobianos.

15 En una realización, el método comprende reducir el recuento de glóbulos blancos en el paciente. En otra realización, el método comprende reducir la duración y/o la frecuencia de tos en el paciente. En una realización adicional, el método comprende reducir los niveles de Bordetella pertussis en la nasofaringe y el pulmón del paciente. En otra realización, el método neutraliza la proteína de la toxina pertussis.

20 Otros aspectos y realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y los ejemplos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La figura 1 muestra un gel SDS PAGE de un anticuerpo hu1B7 humanizado en condiciones reductoras y no reductoras.

La figura 2 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo hu1B7 humanizado.

30 La figura 3 muestra un gel SDS PAGE de un anticuerpo hu11E6 humanizado en condiciones reductoras y no reductoras.

La figura 4 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño de un anticuerpo hu11E6 humanizado.

35 La figura 5 muestra la cromatografía de exclusión por tamaño, de izquierda a derecha, de un anticuerpo hu1B7A humanizado (tercera línea), hu11E6A (primera línea), y una mezcla de los dos anticuerpos (segunda línea). Los resultados se miden en ml frente a mAu, y todas las líneas se comparan con el peso molecular esperado (PM, línea de color negro perpendicular).

40 Las figuras 6A-6D muestran el despliegue térmico representado como Temperatura (°C) frente a Fluorescencia para un anticuerpo hu11E6 humanizado, un anticuerpo hu1B7 humanizado, un anticuerpo m11E6 murino y un anticuerpo m1B7 murino. La figura 6A muestra el despliegue térmico del anticuerpo hu11E6 (hu11E6-15x). La línea superior corresponde a hu11E6-15x 10 uM, la segunda línea desde arriba corresponde a hu11E6-15x 20 uM, la segunda línea desde abajo corresponde a hu11E6-15x 5 uM, y la línea inferior corresponde a PBS. La figura 6B muestra el despliegue

45 térmico del anticuerpo hu1B7. La línea superior corresponde a hu1B7 20 uM, la segunda línea desde arriba corresponde a hu1B7 10 uM, la segunda línea desde abajo corresponde a hu1B7 5 uM, y la línea inferior corresponde a PBS. La figura 6C muestra el despliegue térmico del anticuerpo m11E6. La línea superior corresponde a m11E6 3 uM, la segunda línea desde arriba corresponde a m11E6 1,5 uM, la segunda línea desde abajo corresponde a m11E6 0,75 uM, y la línea inferior corresponde a PBS. La figura 6D muestra el despliegue térmico para el anticuerpo m1B7.

50 La línea superior corresponde a m1B7 3 uM, la segunda línea desde arriba corresponde a m1B7 1,5 uM, la segunda línea desde abajo corresponde a m1B7 0,75 uM, y la línea inferior corresponde a PBS.

La figura 7 muestra los resultados de un ensayo ELISA de toxina Pertussis ferina (PTx) que compara las afinidades de unión a PTx de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados frente a los anticuerpos m1B7 y m11E6 de ratón.

55 Los resultados se muestran como la concentración de anticuerpos (nM) frente a la absorbancia normalizada.

La figura 8 muestra los resultados de un ensayo ELISA de competición que determina las afinidades de unión a PTx de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados producidos en dos laboratorios diferentes. Los resultados se muestran como concentración de PTx frente a absorbancia.

60 La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de protección in vitro de células CHO que mide la capacidad de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados para neutralizar la proteína de la toxina pertussis. Los resultados se

muestran en relaciones molares (mol de mAb/mol de PTx).

La figura 10 muestra los resultados de un ensayo ELISA de toxina PTx junto con los valores de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para una mezcla de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados. Los anticuerpos se mezclaron y se almacenaron a 4 °C durante 1 minuto, 1 hora y 22 horas. Los resultados se muestran como la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$) frente a la absorbancia normalizada.

La figura 11 demuestra las semividas de eliminación (β) ($t_{1/2\beta}$) de un anticuerpo hu11E6 humanizado, un anticuerpo hu1B7 humanizado y una mezcla de los anticuerpos hu1B7 humanizados y hu11E6 humanizado. Todas las semividas se determinaron en ratones.

La figura 12 muestra los resultados de un ensayo ELISA de toxina PTx que determina los efectos del tratamiento térmico sobre la actividad del anticuerpo hu1B7A humanizado. Específicamente, se incubaron 50 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo en PBS durante 30 minutos sobre hielo, a 50 °C, o a 70 °C, y se inactivaron en hielo durante 1 minuto. Los resultados se miden como la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$) frente a la absorbancia.

La figura 13 muestra los resultados de un ensayo ELISA de toxina PTx que determina los efectos del tratamiento térmico sobre la actividad del anticuerpo hu11E6A humanizado. Específicamente, se incubaron 50 $\mu\text{g/ml}$ del anticuerpo en PBS durante 30 minutos sobre hielo, a 50 °C, o a 70 °C, y se inactivaron en hielo durante 1 minuto. Los resultados se miden como la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$) frente a la absorbancia.

La figura 14 muestra los resultados de un ensayo ELISA de toxina PTx junto con los valores de CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) para un anticuerpo hu1B7A humanizado, un anticuerpo hu11E6A humanizado y una mezcla de los dos anticuerpos. Los resultados se muestran como la concentración de anticuerpos ($\mu\text{g/ml}$) frente a la absorbancia normalizada.

La figura 15 muestra la eficacia de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados en el tratamiento de ratones infectados con la cepa de *B. pertussis* D420 (según se mide por % de aumento de peso). Los ratones se trataron con PBS, P-IVIG, un anticuerpo m1B7 murino, un anticuerpo ch1B7, un anticuerpo hu1B7 humanizado, un anticuerpo m11E6 murino, un anticuerpo ch11E6, un anticuerpo hu11E6 humanizado o una mezcla de anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados, y su peso corporal se midió a los 10 días después de la infección. Los ratones sin tratar no infectados sirvieron como control de referencia.

Las figuras 16A y 16B muestran la eficacia de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados en el tratamiento de ratones infectados con la cepa de *B. pertussis* D420 (según se mide por el recuento de leucocitos por 50 μl de sangre). Los ratones se trataron con PBS, P-IVIG, un anticuerpo m1B7 murino, un anticuerpo ch1B7, un anticuerpo hu1B7 humanizado, un anticuerpo m11E6 murino, un anticuerpo ch11E6, un anticuerpo hu11E6 humanizado o una mezcla de anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados, y su recuento de leucocitos en sangre se evaluó a los 3 días y 10 días después de la infección. Los ratones sin tratar no infectados sirvieron como control de referencia.

La figura 17 muestra la eficacia de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados para reducir la colonización de los pulmones de ratón por la bacteria de *B. pertussis*.

Las figuras 18A y 18B muestran el efecto terapéutico de un cóctel de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados sobre babuinos infectados con *B. pertussis*. Específicamente, se evaluaron los recuentos de glóbulos blancos y de tos.

La figura 19 muestra las secciones de patología de los pulmones de babuinos infectados con *B. pertussis* que se trataron con los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados.

Las figuras 20A y 20B muestran el efecto terapéutico de un cóctel de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados sobre babuinos infectados con *B. pertussis*. Específicamente, se evaluaron los recuentos de glóbulos blancos y los recuentos bacterianos de lavado nasal.

Las figuras 21A y 21B muestran la concentración sérica del anticuerpo y semivida del anticuerpo, respectivamente, de los anticuerpos 11E6 y 1B7 humanizados en dos babuinos infectados con *B. pertussis* (es decir, el babuino N.º 12913 y 15913). El tiempo que se muestra en el eje Y de la figura 21A es como se muestra en las figuras 20A y 20B (es decir, infección en el tiempo = 0, tratamiento a los 3 días).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se basa, en parte, al descubrimiento de anticuerpos 1B7 y 11E6 humanizados que exhiben actividades biológicas mejoradas. Debido a la actividad de unión y/o neutralización de estos anticuerpos contra la proteína de la toxina pertussis, son útiles para tratar pacientes infectados con la bacteria *Bordetella pertussis*. Los

anticuerpos divulgados están modificados para dirigirse a la proteína de la toxina pertussis con alta especificidad causando al mismo tiempo efectos secundarios mínimos en los pacientes. Además, los anticuerpos divulgados exhiben una estabilidad mejorada y semividas in vivo prolongadas. Se analizan diversas características y aspectos de la invención con más detalle a continuación.

5

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique de otro modo, el término "anticuerpo" significa un anticuerpo intacto (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal intacto) o un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal), incluyendo un anticuerpo intacto o un fragmento de unión a antígeno que se ha modificado, diseñado o conjugado químicamente, o que es un anticuerpo humano. Los ejemplos de anticuerpos que se han modificado o diseñado son anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecífico). Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, scFv), minicuerpos y diacuerpos. Un anticuerpo conjugado con un resto de toxina es un ejemplo de un anticuerpo conjugado químicamente.

15 Anticuerpos que se unen a la proteína de la toxina Pertussis

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo 1B7 humanizado que se une a una proteína de la toxina pertussis. En diversas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo no humano que se ha alterado para aumentar su similitud con un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado es un anticuerpo genéticamente modificado en el que al menos una CDR (o fragmento funcional del mismo) de un anticuerpo no humano, por ejemplo, de ratón ("anticuerpo donante", que también puede ser de rata, hámster u otra especie no humana) se injerta en un anticuerpo humano ("anticuerpo aceptor"). En algunas realizaciones, se injerta más de una CDR de ratón (por ejemplo, se injertan las seis CDR de ratón). La secuencia del anticuerpo aceptor puede ser, por ejemplo, una secuencia de anticuerpo humano madura (o fragmento de la misma), una secuencia consenso de una secuencia de anticuerpo humano (o fragmento de la misma), o una secuencia de la región de la línea germinal (o fragmento de la misma). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo que tiene una o más CDR de un anticuerpo donante y un marco de región variable (FR). El FR puede formar parte de una región constante dentro de un anticuerpo humano.

Además, para conservar una alta afinidad de unión, los aminoácidos en la secuencia aceptora humana pueden ser reemplazados por los aminoácidos correspondientes de la secuencia donante, por ejemplo, donde: (1) el aminoácido está en una CDR; (2) el aminoácido está en la región marco humana (por ejemplo, el aminoácido está inmediatamente adyacente a una de las CDR). Véanse, las Patentes de EE.UU. N.º 5.530.101 y 5.585.089, que proporcionan instrucciones detalladas para la construcción de anticuerpos humanizados. De hecho, esta selección de residuos en, por ejemplo, la región marco humana es a menudo principal para una deseabilidad de anticuerpos humanizados. Aunque los anticuerpos humanizados a menudo incorporan las seis CDR (por ejemplo, según lo definido por Kabat, pero a menudo también incluyen el bucle hipervariable H1 según lo definido por Chothia) de un anticuerpo de ratón, también se pueden hacer con menos CDR de ratón y/o menos de la secuencia de CDR de ratón completa (por ejemplo, un fragmento funcional de una CDR).

40

En diversas realizaciones, la región variable de cadena ligera humanizada se fusiona a una región constante de cadena ligera (por ejemplo, kappa humana o una cadena ligera lambda). En diversas realizaciones, la región variable de cadena pesada humanizada se fusiona con una región constante de cadena pesada, que incluye diversos alotipos e isotipos de cada uno. Por ejemplo, la región constante de cadena pesada puede derivarse de cualquier tipo de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD o IgE). En algunas realizaciones, se usa IgG. Para la IgG, la región constante puede provenir de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas realizaciones, se usa IgG1. Además, hay muchos isotipos de cada IgG que se pueden elegir, algunos son de origen natural y otros son derivados de isotipos de origen natural. El tipo de IgG que se elija determinará las funciones efectoras del anticuerpo (por ejemplo, opsonofagocitosis, fijación del complemento, etc.).

50

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo 1B7 humanizado que se une a una proteína de la toxina pertussis, y comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina. La región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos de:

55

Abb1B7:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYWMHWVRQAPGQGLEWIG
NIFPGSGSTNYAQKFQGRVTLTVDSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTR
WLSGAYFDYWGGTTVTVSS (SEQ ID NO:3)

La región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos de:

60

Fra1B7:

QIVLTQSPATLSVSPGERVTLTCSASSSVSFMYWYQQKPGRAPKPLIY
 LTSNLPSTGVPARFSGSGTSTYTLTINSLEAEDAATYYCQQWSSHPPTFGSGTKLEIK
 (SEQ ID NO:11)

La capacidad de un anticuerpo para unirse a un epítipo específico puede describirse mediante la constante de disociación de equilibrio (K_D). En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo 1B7 humanizado que se une a la proteína de la toxina pertussis con una K_D de aproximadamente 20 nM o menos, o aproximadamente 15 nM o menos, o aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 5 nM o menos. En una realización, el anticuerpo 1B7 humanizado se une a la proteína de la toxina pertussis con una K_D de aproximadamente 5 nM o menos o aproximadamente 3 nM o menos. En realizaciones ilustrativas, el anticuerpo 1B7 humanizado se une a la proteína de la toxina pertussis con una K_D de aproximadamente 5 nM, aproximadamente 4,5 nM, aproximadamente 4 nM, aproximadamente 3,5 nM, aproximadamente 3 nM, aproximadamente 2,5 nM, aproximadamente 2 nM, aproximadamente 1,5 nM, aproximadamente 1 nM, o aproximadamente 0,5 nM.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento compiten con un anticuerpo que es capaz de unirse a una proteína de la toxina pertussis. Cuando el anticuerpo humanizado compete con un anticuerpo (anticuerpo competidor) para unirse a una proteína de la toxina pertussis, los anticuerpos humanizados de la invención inhiben (completa o parcialmente) la unión del anticuerpo competidor en un grado medible. La inhibición de la unión puede medirse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. En general, se considera que un anticuerpo humanizado inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo de la competencia (por ejemplo, el anticuerpo 1B7 de ratón como se describe por Sato et al., (1990), *Infection and Immunity*, 58(10): 3369-3374 o el anticuerpo 1B7 humanizado, como se describe por Maynard et al., Patente de EE.UU. N.º 8.653.243), si la unión del anticuerpo competidor al antígeno se reduce en al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, o al menos aproximadamente el 90 %, en presencia del anticuerpo humanizado. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el anticuerpo proporcionado en el presente documento se une a una proteína de toxina pertussis de manera competitiva con un anticuerpo de ratón 1B7 u 11E6 como se describe por Sato et al., (1990), *Infection and Immunity*, 58(10): 3369-3374. En otras realizaciones, el anticuerpo proporcionado en este documento inhibe (completa o parcialmente) la unión de un anticuerpo 1B7 de ratón. En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo proporcionado en el presente documento disminuye la unión de un anticuerpo 1B7 de ratón en un ensayo de competición en aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 % o aproximadamente el 100 %.

35 Producción de anticuerpos

En el presente documento se describen métodos para producir anticuerpos de la invención. Por ejemplo, las moléculas de ADN que codifican regiones variables de cadena ligera y/o regiones variables de cadena pesada se pueden sintetizar químicamente usando la información de secuencia proporcionada en el presente documento. Las moléculas de ADN sintético se pueden ligar a otras secuencias de nucleótidos apropiadas, incluyendo, por ejemplo, secuencias codificantes de región constante, y secuencias de control de expresión, para producir construcciones de expresión génica que codifican los anticuerpos deseados. Como alternativa, las secuencias proporcionadas en el presente documento pueden clonarse a partir de hibridomas mediante técnicas de hibridación o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando sondas de ácido nucleico sintéticas.

Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos deseados pueden incorporarse (ligarse) en vectores de expresión, que pueden introducirse en células huésped a través de técnicas de transfección, transformación o transducción. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos deseados pueden introducirse en las células huésped por transducción retroviral. Las células huésped ilustrativas son células de *E. coli*, células de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), y células de mieloma que de otro modo no producen proteína IgG. Las células huésped transformadas se pueden cultivar en condiciones que permitan a las células huésped expresar los genes que codifican las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de inmunoglobulina.

Las condiciones específicas de expresión y purificación variarán dependiendo del sistema de expresión empleado. Por ejemplo, si un gen se va a expresar en *E. coli*, primero se clona en un vector de expresión colocando el gen diseñado aguas abajo de un promotor bacteriano adecuado, por ejemplo, Trp o Tac, y una secuencia señal procariota. La proteína secretada expresada se acumula en los cuerpos de refracción o inclusión, y puede cosecharse después de la alteración de las células por prensa francesa o sonicación. Después, los cuerpos refráctiles se solubilizan, y las

proteínas se vuelven a plegar y escindir por métodos conocidos en la técnica.

Si el gen manipulado se va a expresar en células huésped eucariotas, por ejemplo, células CHO, primero se inserta en un vector de expresión que contiene un promotor eucariota adecuado, una señal de secreción, potenciadores de 5 IgG, y varios intrones. Este vector de expresión opcionalmente contiene secuencias que codifican toda o parte de una región constante, lo que permite que se exprese una cadena pesada o ligera completa o parcial. La construcción génica puede introducirse en células huésped eucariotas usando técnicas de transfección, transformación o transducción. Las células huésped expresan fragmentos V_L o V_H , heterodímeros V_L-V_H , polipéptidos monocatenarios V_H-V_L o V_L-V_H , cadenas completas pesadas o ligeras de inmunoglobulina, o porciones de los mismos, cada una de las 10 cuales puede unirse a un resto que tiene otra función. En algunas realizaciones, una célula huésped se transfecta con un único vector que expresa un polipéptido que expresa una cadena pesada completa o parcial (por ejemplo, una región variable de cadena pesada) o una cadena ligera (por ejemplo, una región variable de cadena ligera). En otras realizaciones, una célula huésped se transfecta con un único vector que codifica (a) un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada y un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera, o (b) una 15 cadena pesada de inmunoglobulina completa y una cadena ligera de inmunoglobulina completa. En aún otras realizaciones, una célula huésped se cotransfecta con más de un vector de expresión (por ejemplo, un vector de expresión que expresa un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o cadena pesada completa o parcial, y otro vector de expresión que expresa un polipéptido que comprende una región variable de cadena ligera o cadena ligera completa o parcial).

20 Se puede producir un polipéptido que comprende una región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera de inmunoglobulina cultivando una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica dicha región variable, en condiciones que permitan la expresión del polipéptido. Después de la expresión, el polipéptido puede cosecharse y purificarse usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, etiquetas de afinidad tales como etiquetas de glutatión-S-transferasa (GST) e histidina, o por cromatografía (a modo de ejemplo no limitante, basándose en el tamaño, carga y/o unión específica).

30 Se puede producir un anticuerpo monoclonal que se une a la proteína de la toxina pertussis, o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo, cultivando una célula huésped transfectada, transformada o transducida con: (a) un vector de expresión que codifica una cadena pesada de inmunoglobulina completa o parcial, y un vector de expresión separado que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina completa o parcial; o (b) un vector de expresión único que codifica ambas cadenas (por ejemplo, cadenas pesadas y ligeras completas o parciales), en condiciones que permitan la expresión de ambas cadenas. El anticuerpo intacto (o fragmento de unión a antígeno) puede cosecharse y purificarse usando técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, proteína A, proteína G, etiquetas de afinidad 35 tales como glutatión-S-transferasa (GST) y etiquetas de histidina o por cromatografía. Está dentro de la habilidad ordinaria en la técnica expresar la cadena pesada y la cadena ligera a partir de un único vector de expresión o de dos vectores de expresión separados.

Modificaciones de anticuerpos

40 Existen métodos estándar para reducir o eliminar la antigenicidad de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se conocen en la técnica. Cuando los anticuerpos se van a administrar a un ser humano, los anticuerpos preferiblemente se "humanizan" para reducir o eliminar la antigenicidad en seres humanos. Se contempla que los anticuerpos humanizados tengan al menos la misma, o sustancialmente la misma, afinidad por el antígeno que el anticuerpo de 45 ratón no humanizado del que se deriva.

Sin embargo, se observa que si bien los enfoques de humanización son conocidos en la técnica, dichos enfoques de humanización a menudo se ven obstaculizados por reducciones en la afinidad (por ejemplo, en relación con el anticuerpo murino original). Esto puede ser, sin desear quedar sujeto a la teoría, debido al hecho de que las CDR no 50 mantienen una configuración viable por los marcos humanos. En este caso, se realizan una pequeña cantidad de cambios en las secuencias marco humanas. Estos cambios de aminoácidos individuales mejoran la afinidad sin hacer desviaciones significativas de la estructura de anticuerpos humanos para que los anticuerpos continúen pareciéndose a los anticuerpos humanos. De esa manera, los anticuerpos pueden usarse con fines terapéuticos en seres humanos sin inducir una respuesta inmunológica. La elección de los aminoácidos a cambiar y los cambios específicos a realizar 55 son parte de la presente invención.

En un enfoque de humanización, se crean proteínas quiméricas en las que las regiones constantes de inmunoglobulina de ratón se reemplazan con regiones constantes de inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Morrison et al., 1984, PROC. NAT. ACAD. SCI. 81:6851-6855, Neuberger et al., 1984, NATURE 312:604-608; Patentes de EE.UU. 60 N.º 6.893.625 (Robinson); 5.500.362 (Robinson); y 4.816.567 (Cabilly).

En un enfoque conocido como injerto de CDR, las CDR de las regiones variables de cadena ligera y pesada se injertan

en marcos de otra especie. Por ejemplo, las CDR murinas y los residuos no CDR implicados en la unión al antígeno pueden injertarse en secuencias humanas. Los residuos involucrados en el mantenimiento de la estructura del sitio de combinación y los residuos involucrados en el mantenimiento del contacto VL:VH también pueden injertarse. El injerto de CDR se describe en las Patentes de EE.UU. N.º 7.022.500 (Queen); 6.982.321 (Winter); 6.180.370 (Queen); 5 6.054.297 (Carter); 5.693.762 (Queen); 5.859.205 (Adair); 5.693.761 (Queen); 5.565.332 (Hoogenboom); 5.585.089 (Queen); 5.530.101 (Queen); Jones et al. (1986) NATURE 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) NATURE 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) SCIENCE 239: 1534-1536; y Winter (1998) FEBS LETT 430: 92-94.

En un enfoque llamado injerto de CDR abreviadas, las CDR abreviadas, según lo definido por Padlan et al., (1995) 10 FASEB J 9: 133-139, y los residuos no CDR implicados en la unión al antígeno, se trasplantan en una secuencia humana. Los residuos involucrados en el mantenimiento de la estructura del sitio de combinación y los residuos involucrados en el mantenimiento del contacto VL:VH también pueden injertarse.

Otros métodos para reducir la inmunogenicidad incluyen "transferencia de SDR", "recubrimiento" y 15 "frankensteinización". Véanse, por ejemplo, Padlan et al., (1995) FASEB J 9:133-139, Wu et al., (1992) MOL IMMUNOL 29:1141-1146, y Padlan et al., (1991) MOL IMMUNOL 28:489-498. En el enfoque de transferencia de SDR, los residuos implicados en la unión al antígeno (es decir, los residuos determinantes de la especificidad o SDR) se trasplantan a una secuencia humana. Los residuos involucrados en el mantenimiento de la estructura del sitio de combinación y los residuos involucrados en el mantenimiento del contacto VL:VH también pueden trasplantarse. En el 20 enfoque de recubrimiento, los residuos de aminoácidos accesibles de superficie en el anticuerpo murino se reemplazan por residuos de aminoácidos que se encuentran con mayor frecuencia en las mismas posiciones en un anticuerpo humano. Por ejemplo, los residuos marco, que están expuestos al disolvente, se reemplazan con sus homólogos de una secuencia humana. Se conservan las CDR y los residuos no CDR implicados en la unión al antígeno. En el enfoque de Frankensteinización, las CDR se trasplantan en una secuencia compuesta construida a partir de las 25 regiones marco humanas más similares. Los residuos involucrados en el mantenimiento de la estructura del sitio de combinación y los residuos involucrados en el mantenimiento del contacto VL:VH también pueden trasplantarse.

Se puede usar cualquier enfoque adecuado, incluyendo cualquiera de los enfoques anteriores, para reducir o eliminar 30 la inmunogenicidad humana de un anticuerpo.

Además, es posible crear anticuerpos completamente humanos en ratones. Los mAb completamente humanos que carecen de cualquier secuencia no humana pueden prepararse a partir de ratones transgénicos de inmunoglobulina humana mediante técnicas a las que se hace referencia en, por ejemplo, Lonberg et al., NATURE 368:856-859, 1994; Fishwild et al., NATURE BIOTECHNOLOGY 14:845-851, 1996; y Mendez et al., NATURE GENETICS 15:146-156, 35 1997. Los mAb humanos también pueden prepararse y optimizarse a partir de bibliotecas de presentación en fagos mediante técnicas a las que se hace referencia en, por ejemplo, Knappik et al., J. MOL. BIOL. 296:57-86, 2000; y Krebs et al., J. Immunol. Meth. 254:67-84 2001).

Si el anticuerpo es para su uso como un producto terapéutico, puede conjugarse con un agente efector tal como una 40 molécula pequeña o un radionúclido utilizando productos químicos de conjugación in vitro estándar. Si el agente efector es un polipéptido, el anticuerpo puede conjugarse químicamente con el efector o unirse al efector como una proteína de fusión. La construcción de proteínas de fusión está dentro de la habilidad en la técnica.

Métodos de uso de anticuerpos

45 En un aspecto, la invención implica el anticuerpo 1B7 humanizado para su uso en el tratamiento de un paciente con Bordetella pertussis, que comprende administrar al paciente el anticuerpo 1B7 humanizado (por ejemplo, en una cantidad eficaz) o composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo.

50 La leucocitosis o elevación en el recuento de glóbulos blancos es característica de las infecciones por Bordetella pertussis. En una realización, el método comprende una reducción en el recuento de glóbulos blancos en el paciente. En una realización, el método da como resultado una aceleración de la resolución de la leucocitosis. En otra realización, el método da como resultado una reducción del recuento máximo de glóbulos blancos durante el curso de la infección.

55 En diversas realizaciones, el método da como resultado una mejora de la tos ferina en el paciente. En una realización, se mejoran los síntomas de tos del paciente. Por ejemplo, el método reduce la frecuencia de tos o la cantidad de tos (o episodios de tos) en el paciente. En diversas realizaciones, el método reduce el número de toses o episodios de tos en al menos aproximadamente 1 por hora, al menos aproximadamente 2 por hora, al menos aproximadamente 3 por hora, al menos aproximadamente 4 por hora, al menos aproximadamente 5 por hora, al menos aproximadamente 6 por hora, al menos aproximadamente 7 por hora, al menos aproximadamente 8 por hora, al menos aproximadamente 9 por hora, al menos aproximadamente 10 por hora, al menos aproximadamente 15 por hora, al menos 60 aproximadamente 20 por hora, al menos aproximadamente 25 por hora, al menos aproximadamente 30 por hora, al

menos aproximadamente 35 por hora, al menos aproximadamente 40 por hora, al menos aproximadamente 45 por hora, al menos aproximadamente 50 por hora, al menos aproximadamente 55 por hora, al menos aproximadamente 60 por hora, al menos aproximadamente 65 por hora, al menos aproximadamente 70 por hora, al menos aproximadamente 75 por hora, al menos aproximadamente 80 por hora, al menos aproximadamente 85 por hora, al menos aproximadamente 90 por hora, al menos aproximadamente 95 por hora, o al menos aproximadamente 100 por hora. En otro ejemplo, el método reduce la duración de la tos en el paciente. Por ejemplo, el método reduce la duración de la tos durante el curso de la infección en al menos aproximadamente tres meses, aproximadamente dos meses, aproximadamente un mes, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, o aproximadamente 1 día. En una realización adicional, el número de sonidos se reduce en el paciente.

En otra realización, el método reduce el nivel de la bacteria *Bordetella pertussis* en la nasofaringe del paciente. En una realización adicional, el método reduce el nivel de la bacteria *Bordetella pertussis* en el pulmón del paciente (por ejemplo, colonización bacteriana pulmonar). Por ejemplo, el método reduce los niveles de *Bordetella pertussis* en la nasofaringe y/o los pulmones en aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, o aproximadamente el 5 %.

En una realización, el método da como resultado la neutralización (inhibición o antagonización) de la proteína de la toxina pertussis. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden unirse a la proteína de la toxina pertussis para inhibir parcial o completamente una o más actividades biológicas de la proteína de la toxina pertussis. Entre las actividades biológicas de una proteína de la toxina pertussis que un anticuerpo neutralizante puede inhibir o bloquear está la capacidad de una proteína de la toxina pertussis para unirse a los receptores celulares. La región de unión al receptor de una proteína de la toxina pertussis consiste en cuatro subunidades de polipéptidos denominadas subunidad S2, subunidad S3, subunidad S4 y subunidad S5, respectivamente. Los ejemplos de receptores celulares que están unidos por las subunidades S2, S3, S4 y S5 de una proteína de la toxina pertussis son miembros de la familia de las sialoglucoproteínas ligadas a N, tales como fetuina, haptoglobina y transferrina. En una realización ilustrativa, los anticuerpos humanizados de la invención evitan que la proteína de la toxina pertussis se una a su receptor celular. En otra realización, los anticuerpos humanizados de la invención alteran los pasos de tráfico intracelular de la toxina pertussis de manera que la toxina no alcanza el citosol celular. Otra actividad importante de una proteína de la toxina pertussis que puede inhibirse por los anticuerpos de la invención es la actividad enzimática de la proteína de la toxina pertussis como ribosilasa ADP hacia las proteínas G. La subunidad que confiere a la actividad enzimática como ADP-ribosilasa en una proteína de la toxina pertussis es la subunidad S1. En algunas realizaciones, la proteína de la toxina pertussis es una holotoxina pertussis. Una holotoxina pertussis, como se denomina en el presente documento, como una proteína de la toxina pertussis que incluye las cinco subunidades de proteína de toxina pertussis. En otras realizaciones, la proteína de la toxina pertussis es una proteína de la toxina pertussis truncada. Una proteína pertussis truncada como se denomina en el presente documento incluye al menos una de las subunidades de proteína de toxina pertussis (es decir, S1, S2, S3, S4 y S5). Las proteínas de la toxina pertussis de diversas formas se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. N.º 8.653.243.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos son útiles en el tratamiento o prevención de cualquiera de las fases de las infecciones por tos ferina. Por ejemplo, el periodo de incubación de la tos ferina suele ser de 7-10 días, con un rango de 4-21 días, y rara vez puede durar hasta 42 días. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos aumentan la duración del periodo de incubación haciendo que la infección sea más difícil de producir. El curso clínico de la enfermedad se divide en tres fases. La primera fase, la fase catarral, se caracteriza por la aparición insidiosa de coriza, estornudos, fiebre baja y una tos leve y ocasional, similar al resfriado común. La tos gradualmente se vuelve más grave, y después de 1-2 semanas, comienza la segunda fase, o paroxística. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos reducen la longitud de la fase catarral y, opcionalmente, evitan que avance a la fase paroxística. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos tratan uno o más de coriza, estornudos, fiebre leve y tos. Es durante la fase paroxística en la que generalmente se sospecha un diagnóstico de tos ferina. De forma característica, un paciente tiene estallidos o paroxismos de tos rápida y numerosa, aparentemente debido a la dificultad para expulsar el moco espeso del árbol traqueobronquial. Al final del paroxismo, un esfuerzo inspiratorio largo suele ir acompañado de un característico sonido agudo. Durante tal ataque, el paciente puede volverse cianótico. Los niños y los bebés de corta edad, especialmente, parecen estar muy enfermos y angustiados. El vómito y el agotamiento suelen seguir al episodio. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos reducen la cantidad y/o frecuencia de paroxismos. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos evitan que un paciente se vuelva cianótico. Los ataques paroxísticos ocurren con mayor frecuencia en la noche, con un promedio de 15 ataques cada 24 horas. Durante las primeras 1 o 2 semanas de esta fase, los ataques aumentan en frecuencia, permanecen en el mismo nivel durante 2 a 3 semanas, y después cesan gradualmente. La etapa paroxística generalmente dura de 1 a 6 semanas, pero puede persistir durante hasta 10 semanas. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos reducen la

duración de esta etapa. En la etapa de convalecencia, la recuperación es gradual. La tos se vuelve menos paroxística y desaparece en 2 a 3 semanas. En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos aceleran el inicio de esta fase y/o reducen su duración. Además, en diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos evitan o reducen la reaparición de paroxismos, que pueden ocurrir con infecciones respiratorias posteriores. En 5 diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos evitan o reducen uno o más de la aparición de neumonía bacteriana secundaria, complicaciones neurológicas tales como convulsiones y encefalopatía, hipoxia, otitis media, deshidratación, neumotórax, epistaxis, hematomas subdurales, hernias, prolapso rectales, dificultad para dormir, incontinencia urinaria, neumonía y fractura de costilla. Además, en algunas realizaciones, las presentes composiciones y métodos reducen o previenen la bronquiolitis necrotizante, la neumonía (por ejemplo, de Bordetella 10 pertussis), el edema pulmonar, la hipertensión pulmonar y la muerte.

En una realización, los métodos de la invención implican la administración conjunta del anticuerpo 1B7 humanizado y un anticuerpo 11E6 humanizado al paciente. En algunas realizaciones, la administración conjunta produce efectos sinérgicos. La administración conjunta del anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado puede ser 15 simultánea o secuencial.

En algunas realizaciones, el anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado se administran a un sujeto simultáneamente. El término "simultáneamente", como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado se administran con una separación temporal de no más de 20 60 minutos, tal como no más de aproximadamente 30 minutos, no más de aproximadamente 20 minutos, no más de aproximadamente 10 minutos, no más de aproximadamente 5 minutos, o no más de aproximadamente 1 minuto. La administración del anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado puede realizarse mediante la administración simultánea de una formulación única (por ejemplo, una formulación que comprende el anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado) o de formulaciones separadas (por 25 ejemplo, incluyendo una primera formulación el anticuerpo 1B7 humanizado e incluyendo una segunda formulación el anticuerpo 11E6 humanizado).

La administración conjunta no requiere que los agentes terapéuticos se administren simultáneamente, si el momento de su administración es tal que las actividades farmacológicas del anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 30 se superponen en el tiempo, ejerciendo así un efecto terapéutico combinado. Por ejemplo, el anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado pueden administrarse secuencialmente. El término "secuencialmente", como se usa en el presente documento, significa que el anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado se administran con una separación temporal de más de aproximadamente 60 minutos. Por ejemplo, el tiempo entre la administración secuencial del anticuerpo 1B7 humanizado y el anticuerpo 11E6 humanizado puede ser de más de 35 aproximadamente 60 minutos, más de aproximadamente 2 horas, más de aproximadamente 5 horas, más de aproximadamente 10 horas, más de aproximadamente 1 día, más de aproximadamente 2 días, más de aproximadamente 3 días o más de aproximadamente 1 semana de separación. Los tiempos de administración óptimos dependerán de las tasas de metabolismo, excreción y/o actividad farmacodinámica del anticuerpo 1B7 humanizado y del anticuerpo 11E6 humanizado que se administra.

40 Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención tienen un pico en una concentración sérica (por ejemplo, una semivida beta) de al menos aproximadamente 30, o aproximadamente 35, o aproximadamente 40, o aproximadamente 45, o aproximadamente 50, o aproximadamente 55, o aproximadamente 60, o aproximadamente 65, o aproximadamente 70, o aproximadamente 75, o aproximadamente 80 horas después 45 de la administración, o al menos aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, 50 aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 22 días, aproximadamente 23 días, aproximadamente 24 días, o aproximadamente 25 días). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención tienen semividas prolongadas. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención tienen una semivida in vivo de aproximadamente 200, o aproximadamente 225, o aproximadamente 250, o aproximadamente 275, o aproximadamente 300 horas o aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, 55 aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 22 días, aproximadamente 23 días, aproximadamente 24 días, aproximadamente 25 días, aproximadamente 26 días, aproximadamente 27 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 29 días, 60 aproximadamente 30 días, aproximadamente 31 días, aproximadamente 32 días, aproximadamente 33 días, aproximadamente 34 días, o aproximadamente 35 días, por ejemplo, aproximadamente 1 o aproximadamente 2 semanas, o aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, o aproximadamente 5 semanas).

Por consiguiente, en algunas realizaciones, un paciente puede recibir una primera administración (por ejemplo, infusión o inyección intramuscular (IM)) de los anticuerpos de la invención como parte de un método de tratamiento y puede recibir una administración adicional (por ejemplo, infusión o inyección intramuscular) después de un pico en la concentración sérica y/o la semivida in vivo de los anticuerpos de la presente invención (por ejemplo, la dosis de la administración adicional puede ser idéntica a la primera administración o puede ser menor, por ejemplo, una dosis de mantenimiento). En algunas realizaciones, la administración adicional es aproximadamente un día desde la primera administración, o aproximadamente una semana desde la primera administración. En algunas realizaciones, los presentes métodos proporcionan aproximadamente 1-3 (por ejemplo, aproximadamente 1, o aproximadamente 2, o aproximadamente 3) dosis (por ejemplo, dosis IV o dosis IM) de los anticuerpos de la presente invención por semana (o aproximadamente cada 5, o 6, o 7, o 10 días). En algunas realizaciones, los presentes métodos mantienen una ventana terapéutica de niveles de anticuerpos en el suero sanguíneo de aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 75 µg/ml, o aproximadamente 100 µg/ml, o aproximadamente 125 µg/ml, o aproximadamente 150 µg/ml, o aproximadamente 175 µg/ml, o aproximadamente 200 µg/ml, o aproximadamente 225 µg/ml, o aproximadamente 250 µg/ml, o aproximadamente 300 µg/ml. En algunas realizaciones, los presentes métodos permiten una dosificación infrecuente y/o una dosificación inferior (por ejemplo, semividas más largas que permiten una dosificación inferior y menos frecuente).

Se puede administrar primero el anticuerpo 1B7 humanizado o el anticuerpo 11E6 humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo 1B7 humanizado se puede administrar a un sujeto después del tiempo en el que se administra el anticuerpo 11E6 humanizado. En este caso, generalmente es deseable administrar el anticuerpo 1B7 humanizado antes del momento en el que aproximadamente el 50 % (por ejemplo, antes del momento en el que aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, o aproximadamente el 5 %) del anticuerpo 11E6 humanizado es metabolizado o excretado por el sujeto, o el momento en el que el anticuerpo 11E6 humanizado ha alcanzado aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 100 % de su actividad farmacodinámica. En otro ejemplo, el anticuerpo 1B7 humanizado se puede administrar a un sujeto antes de la administración del anticuerpo 11E6 humanizado. En este caso, generalmente es deseable administrar el anticuerpo 11E6 humanizado antes del momento en el que aproximadamente el 50 % (por ejemplo, antes del momento en el que aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 10 %, o aproximadamente el 5 %) del anticuerpo 1B7 humanizado es metabolizado o excretado por el sujeto, o el momento en el que el anticuerpo 1B7 humanizado que se administra ha alcanzado aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 100 % de su actividad farmacodinámica.

La administración conjunta tampoco requiere que los agentes terapéuticos se administren al paciente por la misma vía de administración. Más bien, cada agente terapéutico puede administrarse por cualquier ruta apropiada, por ejemplo, por vía parenteral o no parenteral. En una realización, los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral al sujeto. En otra realización, los agentes terapéuticos pueden administrarse por vía parenteral, incluyendo, por ejemplo, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intraarticular, entre otros. En una realización, los agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intramuscular al sujeto.

En otra realización, el método incluye administrar a un paciente el anticuerpo 1B7 humanizado junto con agentes antimicrobianos. Se contempla que la administración conjunta del anticuerpo 1B7 humanizado junto con agentes antimicrobianos produce efectos sinérgicos. Los agentes antimicrobianos ilustrativos que se pueden usar para la invención incluyen, pero sin limitación, azitromicina, claritromicina, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, roxitromicina, cetólidos (por ejemplo, telitromicina) ampicilina, amoxicilina, tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas (por ejemplo, ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina) y cefalosporinas. En una realización, el agente antimicrobiano es eritromicina.

En diversas realizaciones, el método trata pacientes humanos. En una realización, el paciente humano es un bebé. En una realización, el paciente humano es un recién nacido. En otra realización, el paciente humano es un neonato que tiene menos de cuatro semanas, menos de tres semanas, menos de dos semanas, menos de una semana, menos de seis días, menos de cinco días, menos de cuatro días, menos de tres días, menos de dos días o menos de un día de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tiene un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses o seis meses de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tiene una edad en el rango de aproximadamente 6 a aproximadamente 18 meses, de aproximadamente 18 a aproximadamente 36 meses, de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 años, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 años, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 años, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 años, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 años, de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 años, de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 años, de aproximadamente 35 a aproximadamente 40 años, de aproximadamente 40 a

aproximadamente 45 años, de aproximadamente 45 a aproximadamente 50 años, de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 años, de aproximadamente 55 a aproximadamente 60 años, de aproximadamente 60 a aproximadamente 65 años, de aproximadamente 65 a aproximadamente 70 años, de aproximadamente 70 a aproximadamente 75 años, de aproximadamente 75 a aproximadamente 80 años, de aproximadamente 80 a aproximadamente 85 años, de aproximadamente 85 a aproximadamente 90 años, de aproximadamente 90 a aproximadamente 95 años, o de aproximadamente 95 a aproximadamente 100 años de edad.

Se describe un método para prevenir la infección por Bordetella pertussis en un sujeto previamente expuesto a la bacteria, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo 1B7 humanizado o composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo. El método puede proporcionar un tratamiento profiláctico eficaz para prevenir la infección por Bordetella pertussis en un sujeto expuesto a la bacteria.

El anticuerpo de la invención (por ejemplo, anticuerpo hu1B7 humanizado) puede utilizarse en aplicaciones profilácticas en un sujeto que no ha sido vacunado previamente contra la bacteria. El anticuerpo de la invención puede administrarse a un sujeto como un tratamiento profiláctico antes de que el sujeto reciba una vacuna contra la tos ferina. El anticuerpo de la invención puede utilizarse en tratamientos profilácticos de un sujeto que tiene menos de un año, menos de once meses, menos de diez meses, menos de nueve meses, menos de ocho meses, menos de siete meses, menos de seis meses, menos de cinco meses, menos de cuatro meses, menos de tres meses, menos de dos meses, menos de un mes, menos de cuatro semanas, menos de tres semanas, menos de dos semanas, menos de una semana, menos de seis días, menos de cinco días, menos de cuatro días, menos de tres días, menos de dos días, o menos de un día de edad. Por consiguiente, los presentes métodos pueden implicar reducir el tiempo entre el nacimiento y la vacunación en un paciente infantil.

Los métodos pueden tratar o prevenir la infección por Bordetella pertussis en un sujeto previamente vacunado contra la bacteria. El sujeto puede ser un bebé o un niño vacunado con DtaP (por ejemplo, INFANRIX (con tres antígenos, principalmente toxina pertussis (PT) y FHA), TRIPEDIA (que contiene dos componentes, FHA y PT, en cantidades equivalentes) y DAPTACEL (que contiene cinco componentes, PT, FHA, pertactina y fimbrias tipos 2 y 3)). El sujeto puede ser un adulto vacunado con la vacuna de refuerzo contra la tos ferina Tdap (por ejemplo, BOOSTRIX (con tres antígenos de tos ferina (PT, FHA y pertactina) en una cantidad reducida en comparación con INFANRIX) y ADACEL (con los mismos cinco componentes de tos ferina que DAPTACEL pero con una cantidad reducida de PT). El paciente puede haber recibido o no una de las siguientes vacunas combinadas contra la tos ferina: PEDIARIX, PENTACEL, o KINRIX.

Se contempla que los anticuerpos humanizados de la invención puedan funcionar además como adyuvantes para vacunas tales como DtaP o Tdap. Además, los métodos pueden tratar o prevenir la infección por Bordetella pertussis en un sujeto que no ha sido vacunado previamente contra la bacteria.

En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos complementan o suplantán el tratamiento con palivizumab (SYNAGIS).

En diversas realizaciones, las presentes composiciones y métodos pueden tratar infecciones por tos ferina que tienen diversas cepas como su etiología, incluyendo, a modo de ejemplo no limitativo, tos ferina pertactina negativa.

Además, Bordetella parapertussis es una especie estrechamente relacionada con Bordetella pertussis. Ambas bacterias están vinculadas a brotes de tos ferina en seres humanos y producen factores de virulencia similares. La coinfección de Bordetella pertussis y Bordetella parapertussis no es inusual. Por consiguiente, se divulga un método para tratar a un paciente con parapertussis de Bordetella, que comprende administrar al paciente el anticuerpo 1B7 humanizado o composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo. El método de la invención puede prevenir la infección por Bordetella parapertussis en un sujeto previamente expuesto a la bacteria, que comprende administrar al sujeto el anticuerpo 1B7 humanizado o composiciones farmacéuticas que incluyen el anticuerpo.

Los métodos pueden ser eficaces para tratar la infección por Bordetella pertussis y/o la infección por Bordetella parapertussis cuando el anticuerpo 1B7 humanizado se administra al paciente aproximadamente 3 meses después de la infección. Los métodos pueden ser eficaces para tratar la infección por Bordetella pertussis y/o la infección por Bordetella parapertussis cuando el anticuerpo 1B7 humanizado se administra al paciente aproximadamente 2 meses, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 7 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días o aproximadamente 1 día después de la infección. El anticuerpo 1B7 humanizado puede administrarse al paciente el día de la infección.

Como se usa en el presente documento, "tratar", "tratando" y "tratamiento" significan el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, en un ser humano. En diversas realizaciones, esto incluye: (a) inhibir la enfermedad, es

decir, detener su desarrollo y/o (b) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la patología.

Composiciones farmacéuticas y administración

5 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse para tratamiento terapéutico o profiláctico. Para dichos usos, un anticuerpo se combina preferiblemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa tampones, vehículos y excipientes adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación razonable de beneficio/riesgo. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los demás ingredientes de las formulaciones y no perjudiciales para el receptor. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen tampones, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica.

15 Las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos, tales como las divulgadas en el presente documento, pueden presentarse en una forma de unidad de dosificación y pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Una composición farmacéutica debe formularse para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración son administración oral, intranasal, pulmonar, intravenosa (IV), intradérmica, por inhalación, transdérmica, tópica, transmucosa, subcutánea, intramuscular (IM), intraperitoneal y rectal. En una realización, la ruta de administración para los anticuerpos de la invención es la infusión IV. En otra realización, la ruta de administración para los anticuerpos de la invención es la inyección IM.

25 Se pueden preparar formulaciones útiles mediante métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse como un sistema de dispersión coloidal, complejo macromolecular, nanocápsula, microesfera, perla, emulsión de aceite en agua, micela, micela mixta o liposoma. Por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed. (Mack Publishing Company, 1990).

30 Los componentes de formulación adecuados para administración parenteral incluyen un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como EDTA; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa.

35 Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELRM (BASF, Parsippany, NJ) o una solución salina tamponada con fosfato (PBS). El vehículo debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe preservarse contra microorganismos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos.

40 Las composiciones proporcionadas en el presente documento, en solitario o en combinación con otros componentes adecuados, pueden convertirse en formulaciones en aerosol (es decir, "nebulizadas") para administrarse por inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden colocar en propulsores presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

45 Las formulaciones farmacéuticas son preferiblemente estériles. La esterilización se puede lograr, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización por filtración se puede realizar antes o después de la liofilización y la reconstitución.

50 La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada en un envase que contenga cantidades específicas de la preparación, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos en cartuchos o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, comprimido, cápsula amilácea o caramelo, o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de estos en forma envasada. La composición también puede contener otros agentes terapéuticos compatibles. Por ejemplo, la composición puede incluir adicionalmente agentes antimicrobianos descritos en el presente documento.

60 Las administraciones combinadas contemplan la administración conjunta, usando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo mientras que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. En una realización, una composición farmacéutica de la invención incluye una formulación del anticuerpo 1B7 humanizado. En una realización adicional, una composición farmacéutica de la invención incluye una formulación

conjunta tanto del anticuerpo 1B7 humanizado como de un anticuerpo 11E6 humanizado.

Se apreciará que la dosis real de los anticuerpos (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) que se administrarán según la presente invención variará según, por ejemplo, la forma de dosificación particular y el modo de administración. Pueden tenerse en cuenta muchos factores que puedan modificar la acción de los anticuerpos (por ejemplo, peso corporal, sexo, dieta, tiempo de administración, vía de administración, velocidad de excreción, estado del sujeto, combinaciones de fármacos, disposición genética y sensibilidades de reacción) por los expertos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden determinar las proporciones óptimas de administración para un conjunto de afecciones específico utilizando pruebas de administración de dosis convencionales.

10

Las dosis individuales del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) se pueden administrar en formas de dosificación unitarias que contienen, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 950 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 600 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 550 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 450 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg de principio activo, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg por forma de dosificación unitaria, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg por forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, una forma de dosificación unitaria puede ser aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg, aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 950 mg, o aproximadamente 1.000 mg, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos.

En una realización, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) se administra en una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg diarios, una cantidad de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1.000 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 950 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 900 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 850 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 800 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 750 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 700 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 650 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 600 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 550 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 450 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 400 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 350 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 300 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 250 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 200 mg diarios, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 150 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 95 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 85 mg

- diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 80 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 75 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 70 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 65 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 60 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 55 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 50 mg
- 5 diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 45 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 40 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 35 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 30 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 25 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 15 mg
- 10 aproximadamente 10 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 3 mg diarios, de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 1 mg diarios, o de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 80 mg diarios. En diversas realizaciones, el anticuerpo se administra a una dosis diaria de aproximadamente 0,01 mg, aproximadamente 0,02 mg, aproximadamente 0,03 mg, aproximadamente 0,04 mg, aproximadamente 0,05 mg, aproximadamente 0,06 mg, aproximadamente 0,07 mg, aproximadamente 0,08 mg, aproximadamente 0,09 mg, aproximadamente 0,1 mg, aproximadamente 0,2 mg, aproximadamente 0,3 mg, aproximadamente 0,4 mg, aproximadamente 0,5 mg,
- 15 aproximadamente 0,6 mg, aproximadamente 0,7 mg, aproximadamente 0,8 mg, aproximadamente 0,9 mg, aproximadamente 1 mg, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg,
- 20 aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 350 mg,
- 25 aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 550 mg, aproximadamente 600 mg, aproximadamente 650 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 750 mg, aproximadamente 800 mg, aproximadamente 850 mg, aproximadamente 900 mg, aproximadamente 950 mg, o aproximadamente 1.000 mg, incluyendo todos los valores e intervalos entre los mismos.
- 30 En algunas realizaciones, una dosis adecuada del anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) está en un intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,02 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,04 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg, aproximadamente 0,06 mg/kg, aproximadamente 0,07 mg/kg, aproximadamente 0,08 mg/kg, aproximadamente 0,09 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg,
- 35 aproximadamente 0,2 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 0,4 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 0,6 mg/kg, aproximadamente 0,7 mg/kg, aproximadamente 0,8 mg/kg, aproximadamente 0,9 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,1 mg/kg, aproximadamente 1,2 mg/kg, aproximadamente 1,3 mg/kg, aproximadamente 1,4 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 1,6 mg/kg, aproximadamente 1,7 mg/kg, aproximadamente 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4
- 40 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg,
- 45 aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, o aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos. En otras realizaciones, una dosificación adecuada del anticuerpo en un rango de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a
- 50 aproximadamente 80 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a
- 55 aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, en un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos.
- 60 según ciertas realizaciones de la invención, el anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo hu1B7 humanizado y/o anticuerpo hu11E6) se puede administrar, por ejemplo, más de una vez al día, aproximadamente una vez al día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tres días, aproximadamente una vez a la semana, aproximadamente una vez

cada dos semanas, aproximadamente una vez al mes, aproximadamente una vez cada dos meses, aproximadamente una vez cada tres meses, aproximadamente una vez cada seis meses o aproximadamente una vez al año.

El anticuerpo puede administrarse en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones únicas pueden ser 5 semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica midiendo los niveles sanguíneos del anticuerpo en el sujeto. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente.

En algunos métodos, el anticuerpo de la invención se administra a una dosis para lograr una concentración de 10 anticuerpo en plasma o suero de 1-1000 µg/ml, y en algunos métodos 25-300 µg/ml. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención se puede administrar a una dosis para alcanzar un nivel plasmático o sérico de aproximadamente 1-1000 µg/ml, 1-900 µg/ml, 1-800 µg/ml, 1-700 µg/ml, 1-600 µg/ml, 1-500 µg/ml, 1-400 µg/ml, 1-300 µg/ml, 1-200 µg/ml, 1-100 µg/ml, 10-500 µg/ml, 10-400 µg/ml, 10-300 µg/ml, 10-200 µg/ml, 10-100 µg/ml, 100-400 µg/ml, 100-300 µg/ml, o 100-200 µg/ml, incluyendo todos los valores y rangos entre los mismos. Por ejemplo, el anticuerpo de la invención se puede 15 administrar a una dosificación para alcanzar un nivel plasmático o sérico de aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 15 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 35 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 45 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 55 µg/ml, aproximadamente 60 µg/ml, aproximadamente 65 µg/ml, aproximadamente 70 µg/ml, aproximadamente 75 µg/ml, aproximadamente 80 µg/ml, 20 aproximadamente 85 µg/ml, aproximadamente 90 µg/ml, aproximadamente 95 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 105 µg/ml, aproximadamente 110 µg/ml, aproximadamente 115 µg/ml, aproximadamente 120 mg µg/ml, aproximadamente 125 µg/ml, aproximadamente 130 µg/ml, aproximadamente 135 µg/ml, aproximadamente 140 µg/ml, aproximadamente 145 µg/ml, aproximadamente 150 µg/ml, aproximadamente 155 µg/ml, aproximadamente 160 µg/ml, aproximadamente 165 µg/ml, aproximadamente 170 µg/ml, aproximadamente 175 µg/ml, aproximadamente 25 180 µg/ml, aproximadamente 185 µg/ml, aproximadamente 190 µg/ml, aproximadamente 195 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 205 µg/ml, aproximadamente 210 µg/ml, aproximadamente 215 µg/ml, aproximadamente 220 mg µg/ml, aproximadamente 225 µg/ml, aproximadamente 230 µg/ml, aproximadamente 235 µg/ml, aproximadamente 240 µg/ml, aproximadamente 245 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml, aproximadamente 255 µg/ml, aproximadamente 260 µg/ml, aproximadamente 265 µg/ml, aproximadamente 270 µg/ml, aproximadamente 275 µg/ml, 30 aproximadamente 280 µg/ml, aproximadamente 285 µg/ml, aproximadamente 290 µg/ml, aproximadamente 295 µg/ml, o aproximadamente 300 µg/ml.

En algunos métodos, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) logra una potencia de al menos aproximadamente 1 UE/ug, al menos aproximadamente 2 UE/ug, al menos aproximadamente 3 35 UE/ug, al menos aproximadamente 4 UE/ug, al menos aproximadamente 5 UE/ug, al menos aproximadamente 6 UE/ug, al menos aproximadamente 7 UE/ug, al menos aproximadamente 8 UE/ug, al menos aproximadamente 9 UE/ug, al menos aproximadamente 10 UE/ug, al menos aproximadamente 15 UE/ug, al menos aproximadamente 20 UE/ug, al menos aproximadamente 25 UE/ug, al menos aproximadamente 30 UE/ug, al menos aproximadamente 35 UE/ug, al menos aproximadamente 40 UE/ug, al menos aproximadamente 45 UE/ug, al menos aproximadamente 50 40 UE/ug, al menos aproximadamente 55 UE/ug, al menos aproximadamente 60 UE/ug, al menos aproximadamente 65 UE/ug, al menos aproximadamente 70 UE/ug, al menos aproximadamente 75 UE/ug, al menos aproximadamente 80 UE/ug, al menos aproximadamente 85 UE/ug, al menos aproximadamente 90 UE/ug, al menos aproximadamente 95 UE/ug, o al menos aproximadamente 100 UE/ug. En algunos métodos, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo hu1B7 humanizado y/o el anticuerpo hu11E6) logra una potencia de al menos aproximadamente 1 UE/ml, al menos 45 aproximadamente 2 UE/ml, al menos aproximadamente 3 UE/ml, al menos aproximadamente 4 UE/ml, al menos aproximadamente 5 UE/ml, al menos aproximadamente 6 UE/ml, al menos aproximadamente 7 UE/ml, al menos aproximadamente 8 UE/ml, al menos aproximadamente 9 UE/ml, al menos aproximadamente 10 UE/ml, al menos aproximadamente 15 UE/ml, al menos aproximadamente 20 UE/ml, al menos aproximadamente 25 UE/ml, al menos aproximadamente 30 UE/ml, al menos aproximadamente 35 UE/ml, al menos aproximadamente 40 UE/ml, al menos 50 aproximadamente 45 UE/ml, al menos aproximadamente 50 UE/ml, al menos aproximadamente 55 UE/ml, al menos aproximadamente 60 UE/ml, al menos aproximadamente 65 UE/ml, al menos aproximadamente 70 UE/ml, al menos aproximadamente 75 UE/ml, al menos aproximadamente 80 UE/ml, al menos aproximadamente 85 UE/ml, al menos aproximadamente 90 UE/ml, al menos aproximadamente 95 UE/ml, o al menos aproximadamente 100 UE/ml. UE significa unidades equivalentes según lo definido por el estándar de suero policlonal de la OMS. El anticuerpo de la 55 invención puede ser capaz de mantener la potencia después de al menos aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 60 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses o aproximadamente 12 meses.

La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de factores tales como la vía de administración, la cantidad de

dosificación, la enfermedad que se está tratando y la semivida del anticuerpo en el paciente. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo periodo de tiempo. En aplicaciones terapéuticas, a veces se requiere una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o se termine, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. A partir de entonces, al paciente se le puede administrar un régimen profiláctico. Las frecuencias de dosificación ilustrativas son una vez al día, dos veces al día, tres veces al día, una vez a la semana y una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la dosificación es una vez cada dos semanas.

10

Se divulgan también kits que pueden simplificar la administración de cualquier agente descrito en el presente documento (por ejemplo, los anticuerpos humanizados con o sin diversos agentes de combinación). Un kit ilustrativo comprende cualquier composición descrita en el presente documento en forma de dosificación unitaria. La dosificación unitaria puede ser un recipiente, tal como una jeringa previamente llena, que puede ser estéril, que contiene cualquier agente descrito en el presente documento y un portador, diluyente, excipiente o vehículo farmacéuticamente estable. El kit puede contener además una etiqueta o instrucciones impresas que informen del uso de cualquier agente descrito en el presente documento. El kit también puede incluir un espéculo de párpado, anestésico tópico y un agente de limpieza para el lugar de administración. El kit también puede contener uno o más agentes adicionales descritos en el presente documento. El kit puede comprender un recipiente que contiene una cantidad eficaz de una composición de la invención y una cantidad eficaz de otra composición, tales como las descritas en el presente documento.

15

20

El kit puede comprender una jeringa precargada en forma de dosis unitaria (por ejemplo, un inyector). Los kits pueden ser adecuados para su uso fuera de un centro médico tradicional, por ejemplo, en el campo, por ejemplo, en el tercer mundo.

25

EJEMPLOS

Los siguientes Ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o contenido de la invención de ninguna manera. Los ejemplos que no están dentro del alcance de las reivindicaciones son solo para fines ilustrativos.

30

Ejemplo 1 Cribado y evaluación de regiones variables de cadena pesada y ligera 11E6 humanizadas

Se generó una construcción plasmídica de expresión que codificaba una cadena pesada 11E6 quimérica. La construcción codificó un anticuerpo con la región variable de ratón seguido de una región constante humana. Específicamente, la construcción codificó la SEQ ID NO: 13 fusionada a una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. De manera similar, se generó una construcción plasmídica de expresión que codificaba una cadena ligera 11E6 quimérica. La construcción codificó la SEQ ID NO: 19 fusionada a una región constante de cadena ligera Kappa humana. Las dos construcciones de expresión también codificaron un promotor, una secuencia 5' no traducida y un péptido señal heterólogo para la expresión en, y secreción de células CHO.

40

Se generó una construcción plasmídica de expresión que codificaba una cadena pesada 11E6 quimérica. La construcción codificó un anticuerpo con la región variable de ratón seguido de una región constante humana. Específicamente, la construcción codificó la SEQ ID NO: 13 fusionada a una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. De manera similar, se generó una construcción plasmídica de expresión que codificaba una cadena ligera 11E6 quimérica. La construcción codificó la SEQ ID NO: 19 fusionada a una región constante de cadena ligera Kappa humana. Las dos construcciones de expresión también codificaron un promotor, una secuencia 5' no traducida y un péptido señal heterólogo para la expresión en, y secreción de células CHO.

45

De manera análoga, se construyeron cuatro plásmidos de expresión que codificaron cadenas pesadas 11E6 humanizadas utilizando las SEQ ID NOs: 14, 15, 17 y 18. Estos se designaron H1, H2, H3 y H4 respectivamente. Se construyeron tres plásmidos de expresión que codificaron cadenas ligeras 11E6 humanizadas utilizando las SEQ ID NOs: 20, 21, y 23. Estos se designaron L1, L2 y L3, respectivamente.

50

Los plásmidos de expresión quiméricos de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células CHO, que después secretaron anticuerpos quiméricos bivalentes en el medio de cultivo tisular. De manera similar, las 12 combinaciones para las construcciones de cadena pesada y ligera humanizadas se cotransfectaron en células CHO. Específicamente, H1 se cotransfectó con L1, L2, L3, y L4; H2 se cotransfectó con L1, L2, L3, y L4; y H3 se cotransfectó con L1, L2, L3, y L4. Se recogieron medios de cada transfección, se cuantificaron los niveles de anticuerpos en las muestras y se determinó la unión a la toxina pertussis por ELISA. Tanto las construcciones quiméricas como las 12 combinaciones humanizadas produjeron anticuerpos que se unieron específicamente a la toxina pertussis. H1 y H4 en combinación con L2 y L3 generaron las señales ELISA más altas. La combinación de H4 y L3 se eligió para una evaluación adicional.

60

Las constantes de disociación (Kd) para el anticuerpo murino parental, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo H4/L3 se determinaron con un ensayo de competición de unión a toxina pertussis. En este ensayo, las concentraciones crecientes de toxina pertussis se exponen a una cantidad constante de anticuerpo. La cantidad de anticuerpo no unido restante se cuantifica por ELISA. Las constantes de disociación para los tres anticuerpos fueron casi idénticas.

5

Por lo tanto, el anticuerpo 11E6 se humanizó sin ninguna pérdida de afinidad frente al anticuerpo murino parental.

Ejemplo 2 Cribado y evaluación de regiones variables de cadena pesada y ligera 1B7 humanizadas

- 10 La misma evaluación se realizó con las secuencias quiméricas 1B7, así como con 20 combinaciones de cadenas pesadas y ligeras 1B7 humanizadas. Se generaron plásmidos de expresión que codificaron las cadenas pesadas y ligeras quiméricas 1B7, SEQ ID NOs: 1 y 7, respectivamente. Se prepararon plásmidos de expresión para cuatro cadenas pesadas humanizadas 1B7 que codificaron las SEQ ID NOs: 2, 3, 5 y 6, que se designaron H1, H2, H3, H4, respectivamente. Se prepararon plásmidos de expresión para cinco cadenas ligeras humanizadas 1B7 que codificaron las SEQ ID NOs: 8, 9, 11, 12, y 10, que se designaron L1, L2, L3, L4, y L5 respectivamente. Para cada plásmido de expresión, el promotor, la región 5' no traducida, el péptido señal y la región constante (IgG1 y Kappa) fueron las mismas que se usaron para las construcciones 11E6 en el Ejemplo 1.

- 20 Los plásmidos que codificaron las cadenas pesadas y ligeras quiméricas se cotransfectaron en células CHO para generar un anticuerpo 1B7 quimérico. Los plásmidos para cada combinación de cadena pesada y ligera 1B7 humanizada también se cotransfectaron en células CHO para producir 20 anticuerpos 1B7 humanizados diferentes. Después, los anticuerpos se evaluaron mediante ELISA de unión a toxina pertussis como se hizo con 11E6 en el Ejemplo 1. H1 y H2, en combinación con L3 y L4, produjeron las señales de ELISA más altas. H2/L3 fue la combinación elegida para un mayor desarrollo. En el ensayo de competición de toxina pertussis, las constantes de disociación para el anticuerpo 1B7 murino parental y el anticuerpo 1B7 humanizado H2/L3 fueron 0,15 y 0,16 nM respectivamente.

25

Por lo tanto, el anticuerpo 1B7 se humanizó sin ninguna pérdida de afinidad frente al anticuerpo murino parental.

Ejemplo 3: Construcción de anticuerpos humanizados que se unen a la proteína de la toxina pertussis

30

Los dos anticuerpos humanizados identificados en los Ejemplos 1 y 2, anteriores, se produjeron en células CHO. Específicamente, para cada anticuerpo, se prepararon dos vectores retrovirales, uno que codificaba la cadena pesada y el segundo que codificaba la cadena ligera. Para cada anticuerpo, el par de vectores retrovirales se usó para transducir repetidamente y modificar genéticamente un conjunto no clonal de células CHO. Las células CHO recombinantes se cultivaron entonces en matraces de agitación durante dos semanas. Cada anticuerpo se purificó del medio de cultivo tisular de células CHO a través de una columna de proteína A. Los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 se analizaron usando gel SDS-PAGE (véanse las figuras 1 y 3). Además, los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6, así como una mezcla de los dos anticuerpos, también se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véanse las figuras 2, 4 y 5). Específicamente, se incubaron 500 µl de los anticuerpos en PBS (100 µg/ml) durante 24 horas a 4 °C y las muestras se ejecutaron en una columna S200 con tampón PBS.

35

40

Los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 se analizaron usando gel SDS-PAGE (véanse las figuras 1 y 3). Además, los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6, así como una mezcla de los dos anticuerpos, también se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véanse las figuras 2, 4 y 5). Específicamente, se incubaron 500 µl de los anticuerpos en PBS (100 µg/ml) durante 24 horas a 4 °C y las muestras se ejecutaron en una columna S200 con tampón PBS.

45

Se obtuvieron los siguientes resultados para el anticuerpo hu1B7 humanizado: concentración: 5,78 mg/ml (usando un coeficiente de absorbancia A280 de 1,64 (mg/ml)⁻¹); endotoxina de <0,25 UE/ml (<0,04 UE/mg); y carga biológica de <0,2 UFC/ml (Pase).

50

Se obtuvieron los siguientes resultados para el anticuerpo hu11E6 humanizado: concentración: 5,62 mg/ml (usando un coeficiente de absorbancia A280 de 1,56 (mg/ml)⁻¹); endotoxina de <0,25 UE/ml (<0,04 UE/mg); y carga biológica de <0,2 UFC/ml (Pase).

55

Como se muestra en la figura 5, las preparaciones de anticuerpos no mostraron agregación aparente.

Ejemplo 4: Fabricación de anticuerpos humanizados

- 60 Se realizó la fabricación a gran escala de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados. Específicamente, los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 se expresaron en células CHO usando tecnología de transducción retroviral seguida de un proceso de purificación de anticuerpos monoclonales. Se identificaron clones y clones de respaldo para

producir cada anticuerpo. Cada clon se caracterizó por la expresión, y se verificó la calidad de los anticuerpos resultantes. El proceso aguas arriba se escaló a 100 l para la producción del anticuerpo hu1B7 y a 250 l para la producción del anticuerpo hu11E6. El proceso aguas arriba utilizó medio de cultivo celular y alimentos libres de suero, definidos químicamente y disponibles comercialmente. El proceso aguas abajo utilizó una purificación de tres etapas por cromatografía secuencial (es decir, proteína A, intercambio aniónico e intercambio catiónico). El proceso de fabricación también incluyó una etapa de inactivación de virus basada en detergente y filtración de flujo tangencial en un tampón de formulación de PBS (pH 7,0) a 10 mg/ml. Las dos preparaciones de anticuerpos se esterilizaron a través de un filtro de 0,2 μ m y se cargaron a granel en botellas de polietileno de alta densidad. Las preparaciones purificadas se almacenaron a largo plazo a -35 °C. Los rendimientos de los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 fueron de 47 y 70 gramos, respectivamente. Este rendimiento es más de un orden de magnitud mayor en comparación con las líneas de fabricación de células CHO generadas por los métodos estándar de transfección de plásmidos.

Se realizó un panel de ensayos bioanalíticos para análisis de lotes y estudios de estabilidad de los anticuerpos fabricados. Estos métodos incluyeron pruebas relacionadas con el producto, tales como la lectura de absorción A280, SDS-PAGE, SE-HPLC, IEF y ensayo de actividad ELISA, así como pruebas relacionadas con el proceso, tales como análisis de ADN y proteína, endotoxina, carga biológica y micoplasma de células huésped. La apariencia, la osmolalidad y el pH también se midieron. Ambos anticuerpos monoclonales exhibieron características superiores en estos ensayos.

20 Ejemplo 5: Caracterización de los anticuerpos

Se usaron ensayos de estabilidad térmica para evaluar la estabilidad de los anticuerpos humanizados hu11E6 y hu1B7, así como sus homólogos murinos, como se muestra en las figuras 6A-6D.

Se realizó un ensayo ELISA para determinar la capacidad de los anticuerpos humanizados hu11E6 y hu1B7 para unirse a la proteína de la toxina pertussis (véase la figura 7). Específicamente, la proteína de la toxina pertussis se usó para el recubrimiento, mientras que anti-HRP de ratón o Fc-HRP anti-humano se usaron como anticuerpos secundarios. Se usó TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato para el ensayo. Se obtuvieron los siguientes datos de CE_{50} (nM):

m1B7: $0,19 \pm 0,01$;
 hu1B7A: $0,23 \pm 0,04$;
 m11E6: $2,7 \pm 0,7$; y
 hu11E6A $1,3 \pm 0,2$.

Como se indicó, los anticuerpos humanizados hu11E6 y hu1B7 exhibieron una alta afinidad por la proteína de la toxina pertussis que es comparable o superior a los anticuerpos murinos.

La figura 8 muestra los resultados de un ensayo ELISA de competición que determina las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6. Las constantes de disociación se ensayaron en preparaciones de anticuerpos generadas en un laboratorio de investigación académica en comparación con las generadas en una Organización de Investigación por Contrato (CRO). Para el ELISA, la proteína de la toxina pertussis se usó para el recubrimiento, mientras que Fc-HRP anti-humano se usó como anticuerpo secundario. Se usó TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) como sustrato.

Se obtuvieron los siguientes datos de K_d (nM):

Laboratorio de investigación hu1B7A = $1,7 \pm 0,2$

CRO hu1B7A $2,6 \pm 0,1$;

Laboratorio de investigación hu11E6A $10,7 \pm 0,3$; y

CRO hu11E6A $11,3 \pm 0,4$.

Las afinidades de unión de los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 también se midieron mediante BIAcore, y los siguientes datos de K_d se obtuvieron como se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

	Kd, ELISA de competición (nM); n= x exp	Kd, BIAcore (nM) (chi2)	Asociación, BIAcore (s ⁻¹ M ⁻¹)	Disociación, BIAcore (s ⁻¹)	Temp. de fusión (°C)
m1B7	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,2 (0,32)	1,7 ± 0,3 x10 ⁵	1,2 ± 0,3 x10 ⁻⁴	74,8 ± 0,7
ch1B7	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,4 (0,74)	1,5 ± 0,1 x10 ⁵	0,8 ± 0,5 x10 ⁻⁴	78,1 ± 0,5
hu1B7A	1,2 ± 0,7	0,7 ± 0,5 (0,75)	0,9 ± 0,2 x10 ⁵	0,7 ± 0,5 x10 ⁻⁴	79,0 ± 0,3
m11E6	5 ± 1	0,2 ± 0,2 * (0,13)	0,8 ± 0,1 x10 ⁵	0,2 ± 0,1 x10 ^{-4*}	67,3 ± 0,4
ch11E6	5 ± 2				69,4 ± 0,4
hu11E6	7 ± 3	0,4 ± 0,7 * (0,26)	0,65 ± 0,05 x10 ⁵	0,3 ± 0,4 x10 ^{-4*}	74,4 ± 0,4

Se realizó un ensayo de protección in vitro de células CHO para comparar la actividad de neutralización de los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6. Los ensayos se realizaron por dos técnicos diferentes (véase la figura 9).
5 Específicamente, este ensayo midió la capacidad de los anticuerpos para neutralizar la proteína de la toxina pertussis. Como se muestra en la figura 9, los anticuerpos humanizados y de ratón fueron comparables en la neutralización de la proteína de la toxina pertussis.

Se preparó una mezcla de los anticuerpos humanizados 11E6 y 1B7 mezclando los anticuerpos y almacenándolos a
10 4 °C durante 1 minuto, 1 hora y 22 horas. La afinidad de unión de la mezcla por la proteína de la toxina pertussis se evaluó usando un ensayo ELISA como se ha descrito previamente (véase la figura 10). Se obtuvieron los siguientes datos de CE₅₀ (nM):

1 minuto = 0,12 ± 0,02;

15

1 hora = 0,10 ± 0,01 y

22 horas = 0,17 ± 0,07

20 Como se evidencia por los datos de CE₅₀, no hubo interacción adversa aparente entre el anticuerpo humanizado hu1B7 y el anticuerpo humanizado hu11E6 tras el almacenamiento como una mezcla que interfiriera con sus afinidades de unión por la proteína de la toxina pertussis.

La Tabla 2 a continuación resume un análisis farmacocinético (PK) del anticuerpo humanizado hu1B7 en comparación
25 con el anticuerpo murino m1B7.

Tabla 2

	Masa inyectada (ug)	AUC _{0->∞} (ug*h/ml)	β _{m187} (h ⁻¹)	t _{1/2β} (h)	b (ug/ml)	Conc. est. a t = 3 días (ug/ml)	Conc. est. a t = 7 días (ug/ml)	Conc. est. a t = 10 días (ug/ml)
m1B7	1*	107,9	0,0033	210	0,36	0,28	0,21	0,16
	5*	539,8	0,0033	210	1,8	1,4	1,03	0,82
	20*	2.159	0,0033	210	7,1	5,6	4,1	3,2
	140	15.114	0,0033	210	49,9	39,3	28,7	22,6
h1B7	1	25±7	0,0078	89	0,20±0,08	0,11±0,03	0,05±0,02	0,03±0,01
	5	127±38	0,0078	89	1,0±0,4	0,6±0,2	0,26±0,08	0,15±0,06
	20	509±149	0,0078	89	3,9±1,6	2,2±0,7	1,0±0,3	0,6±0,2

A partir del análisis PK, se determinó que 5 µg del anticuerpo murino m1B7 protegían completamente a los ratones infectados con B. pertussis y tenían una semivida de eliminación de aproximadamente 210 horas. En comparación,
30 20 ug del hu1B7 humanizado tuvieron una semivida de eliminación de aproximadamente 89 horas (véase la figura 11) y una concentración en sangre similar durante el día 7. Por consiguiente, se esperaba que la dosis de 20 ug del

anticuerpo hu1B7 humanizado protegiera a los ratones infectados de manera similar a la dosis de 5 ug del anticuerpo m1B7 murino. Además, como se muestra en la **figura 10**, el anticuerpo 11E6 humanizado tenía una semivida de eliminación de aproximadamente 128 horas, mientras que una mezcla de los dos anticuerpos tenía una semivida de eliminación de aproximadamente 76 horas.

5

Se realizó un ensayo ELISA para determinar si el calor afectaba a las afinidades de unión de los anticuerpos hu1B7A y hu11E6A humanizados por la proteína de la toxina pertussis (véanse la **figura 12 y 13**). El ensayo ELISA se realizó como se ha descrito previamente. Particularmente, se incubaron 50 µg/ml del anticuerpo en PBS durante 30 minutos sobre hielo, a 50 °C, o a 70 °C, y se inactivaron en hielo durante 1 minuto. Como se muestra en la **figura 12**, el anticuerpo hu1B7A humanizado permaneció estable y no se desplegó irreversiblemente después de 30 minutos de calentamiento a 50 °C o 70 °C. Como se muestra en la **figura 13**, el anticuerpo hu11E6A humanizado permaneció estable después de 30 minutos de calentamiento a 50 °C, pero se desplegó irreversiblemente después del calentamiento a 70 °C.

10

15 Se realizó un ensayo ELISA para comparar las afinidades de unión del anticuerpo hu1B7A o hu11E6A humanizado individual en comparación con la mezcla de los dos anticuerpos (véase la figura 14). El ensayo ELISA se realizó como se ha descrito previamente. Se obtuvieron los siguientes datos de CE₅₀ (nM):

hu1B7A: 0,09 ± 0,01;

20

hu11E6A: 0,61 ± 0,07; y

mezcla de hu1B7A y hu11E6A: 0,29 ± 0,07.

25 **Ejemplo 6: Evaluación de los anticuerpos humanizados en el tratamiento de infecciones por B. pertussis en ratones**

La eficacia de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados en el tratamiento de infecciones por B. pertussis se evaluó en un modelo de ratón.

30

Específicamente, los ratones infectados con la cepa de B. pertussis D420 se trataron con el anticuerpo hu1B7 humanizado, el anticuerpo hu11E6 humanizado y una mezcla de los dos anticuerpos. Los ratones infectados se analizaron posteriormente para determinar su peso corporal y recuento de glóbulos blancos. Como se muestra en la figura 15, el tratamiento con cada anticuerpo humanizado por separado o en combinación permitió un aumento de peso mayor en los ratones infectados que en los tratados con PBS o con el anticuerpo m1B7 murino. Las figuras 16A-16B muestran que el tratamiento con los anticuerpos humanizados también redujo significativamente el recuento de glóbulos blancos de los ratones infectados 3 y 10 días después de las infecciones.

35

También se evaluó el efecto de los tratamientos con anticuerpos sobre la colonización bacteriana pulmonar. Específicamente, los ratones se trataron con PBS, P-IVIG, el anticuerpo hu1B7 humanizado, el anticuerpo hu11E6 humanizado o una mezcla de los dos anticuerpos. La colonización bacteriana pulmonar se evaluó 10 días después de la infección. Los ratones sin tratar no infectados sirvieron como control de referencia. Los ratones infectados se sacrificaron por inhalación de CO₂ el día 10 después de las infecciones, y el tracto respiratorio se extirpó para enumerarlo mediante colocación en placas seriadas en agar Regan Lowe complementado con sangre de oveja al 10 % (Hemostat Resources) que contenía 40 ug/ml de cefalexina. Las colonias se contaron después de 5 días a 37 °C. Como se muestra en la figura 17, los ratones tratados con los anticuerpos mostraron una caída significativa en la colonización bacteriana en comparación con los controles no tratados (PBS) o los animales tratados con P-IVIG. P <0,05 (*) para animales tratados con hu1B7 y hu11E6 en solitario, y P <0,01 (**) para animales tratados con la combinación de hu1B7 y 11E6.

45

50

En conjunto, estos datos apoyan la eficacia in vivo de los anticuerpos hu11E6 y hu1B7 humanizados en el tratamiento de la infección por B. pertussis.

55 **Ejemplo 7: Evaluación de los anticuerpos humanizados en el tratamiento de infecciones por B. pertussis en babuinos**

La eficacia de los anticuerpos hu1B7 y hu11E6 humanizados en el tratamiento de infecciones por B. pertussis se evaluó en un modelo de babuino.

60

Específicamente, se infectaron babuinos macho y hembra destetados (6 a 9 meses) (Papio anubus, babuinos oliva) de aproximadamente 2-3 kg de peso por administración intranasal de la cepa de B. pertussis D420 y se trataron por vía intravenosa con los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6. Los babuinos infectados se analizaron para

detectar signos clínicos de enfermedad (por ejemplo, tos, peso y temperatura), recuentos de glóbulos blancos y/o niveles de transporte nasal de *B. pertussis*.

Para la infección por *B. pertussis*, se suspendió una cepa de *B. pertussis*, D420, en PBS a 10^9 - 10^{10} ufc/ml. Se administró un ml mediante un tubo endotraqueal a la parte superior de la tráquea de babuino. Se administraron 0,5 ml a través de un catéter intranasal en la parte posterior de cada naris. Los babuinos se colocaron en posición sentada durante 3 minutos. Para la flebotomía, se recogieron <5 ml de sangre mediante venopunción con un catéter de mariposa y se dividieron en alícuotas en tubos para la determinación de glóbulos blancos y la separación del suero. A lo largo del estudio, los babuinos se anestesiaron con una inyección intramuscular de ketamina para actividades que incluían infusiones de anticuerpos, infección por *B. pertussis*, extracciones de sangre, lavados nasofaríngeos y observaciones clínicas. Estas actividades se combinaron siempre que fue posible para minimizar el uso de anestesia.

Se realizaron dos estudios. En uno, tres babuinos se infectaron cada uno con 6×10^9 UFC de *B. pertussis*. Tres días después, dos de los animales fueron tratados tanto con los anticuerpos humanizados hu1B7 como hu11E6, y el tercer animal permaneció se tratar. Tres semanas después de la infección, el animal no tratado estaba moribundo y fue sacrificado. Los otros dos animales tratados también fueron sacrificados. Se realizó una evaluación histológica de secciones pulmonares. En el segundo estudio, cuatro babuinos se infectaron con 4×10^9 UFC de *B. pertussis* y tres días después, dos de los animales fueron tratados con los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6, y dos animales permanecieron sin tratamiento. Los anticuerpos se administraron mediante inyección intravenosa, y cada uno se usó a una dosis de 20 mg/kg.

Como se muestra en la figura 18A, el animal no tratado desarrolló una leucocitosis que alcanzó su punto máximo por encima de 40.000 células por ul. En este animal, el recuento de glóbulos blancos siguió elevado. Tres semanas después de la infección, el animal de repente se volvió moribundo y fue sacrificado. En contraste, los recuentos de glóbulos blancos en los animales tratados comenzaron a disminuir en los dos días posteriores a la administración de anticuerpos. Los recuentos continuaron descendiendo y fueron casi normales en una semana. Estos animales permanecieron sanos y se sacrificaron en paralelo con el animal no tratado. El recuento de tos mostró un patrón similar (Figura 18B). El animal de control mostró un rápido aumento de la tos desde el Día 3 hasta el final del estudio con un pico a los 5 días a más de 50 tos por hora. En contraste, los dos animales tratados mostraron tos creciente hasta el Día 3 (tratamiento) que rápidamente disminuyó a cero el Día 4.

Los pulmones de los babuinos infectados se evaluaron mediante examen histopatológico (Figura 19). En la necropsia, se demostró que el animal no tratado tenía un pulmón derecho consolidado. La histopatología de este pulmón demostró neumonía intersticial subaguda grave a crónica, difusa, con formación de abscesos y fibrosis intersticial moderada. El pulmón izquierdo reveló una neumonía intersticial más moderada con mucha menos cicatrización y sin evidencia de formación de abscesos. También hubo pleuritis moderada crónica organizada multifocal con un área de formación de abscesos. En contraste, en la necropsia, los pulmones de los dos animales tratados fueron extremadamente normales. Las secciones de histopatología del pulmón derecho de un animal tratado revelaron neumonía intersticial crónica muy leve con evidencia de fibrosis intersticial muy leve. El pulmón izquierdo era esencialmente normal en apariencia. Para el otro animal tratado, los pulmones derecho e izquierdo tenían una apariencia esencialmente normal con el único hallazgo de hiperplasia linfóide leve a moderada del tejido linfóide asociado a bronquios (BALT). Por lo tanto, el animal no tratado demostró cambios de neumonía grave, mientras que los pulmones de los animales tratados fueron normales o demostraron neumonía muy leve.

Se evaluaron los recuentos de glóbulos blancos y los recuentos bacterianos nasales de los babuinos infectados (Figuras 20A y 20B). Los animales no tratados desarrollaron una leucocitosis que alcanzó su punto máximo muy por encima de 40.000 células por ul. En estos animales, el recuento elevado de glóbulos blancos persistió y no se normalizó el Día 20. En contraste, los dos animales tratados mostraron un recuento elevado de glóbulos blancos en el momento del tratamiento con anticuerpos el Día 3, sin embargo, el recuento de glóbulos blancos nunca alcanzó niveles observados con los animales no tratados, y para el Día 20, los recuentos de glóbulos blancos de ambos animales tratados habían vuelto a los niveles normales. Del mismo modo, los recuentos de células bacterianas de *B. pertussis* en los lavados nasales demostraron una cantidad similar de bacterias el Día 3 (tratamiento). Después del tratamiento con anticuerpos, los niveles bacterianos en la nariz mostraron una disminución rápida de los animales tratados con el cóctel de anticuerpos, mientras que el recuento bacteriano en la nariz de los dos animales de control permaneció muy por encima de 10^3 para el Día 18.

También se midieron la concentración sérica y la semivida de los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6. Para medir la cantidad de los anticuerpos humanizados 1B7 y 11E6 en el suero de babuino después de la administración intravenosa de 20 mg/kg de cada anticuerpo, se tomaron muestras de sangre en varios puntos de tiempo, se aislaron en suero, y se usaron muestras de suero en el ELISA de toxina anti-pertussis (PTx) como se ha descrito previamente en el Ejemplo 4. Específicamente, la proteína de la toxina pertussis se usó para el recubrimiento mientras que el Fc-HRP anti-humano se usó como anticuerpos secundarios. Se usó TMB (3,3',5,5'-

tetrametilbencidina) como sustrato para el ensayo. Se usaron dos babuinos tratados para este análisis (es decir, el babuino N.º 12913 y 15913). La figura 21A muestra la concentración sérica de anticuerpos del anticuerpo hu1B7 humanizado y el anticuerpo hu11E6 humanizado, calculada por la ecuación:

$$5 \text{ Conc. sérica} = ae^{-\alpha t} + be^{-\beta t}$$

La figura 21B muestra la semivida de anticuerpos de los anticuerpos humanizados.

En resumen, ambos anticuerpos humanizados, individualmente o en combinación, mitigaron la pérdida de peso, la leucocitosis y la carga bacteriana pulmonar en un modelo de tos ferina de ratón. Además, en el modelo de babuino, la combinación de anticuerpos revirtió el curso de la enfermedad en ambos animales tratados, lo que les permitió recuperarse rápidamente con histología pulmonar normal o casi normal. Estos datos apoyan la aplicación clínica de los anticuerpos humanizados de la invención como un medio para disminuir la morbilidad, las secuelas a largo plazo y la mortalidad en niños con tos ferina.

15 **Ejemplo 8: Administración profiláctica de anticuerpos humanizados a recién nacidos**

Los anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 se administran mediante inyección intramuscular a los recién nacidos para proporcionar tratamiento profiláctico contra la tos ferina mediante inmunización pasiva. Dado que la tos ferina durante los primeros cuatro meses de vida augura el mayor riesgo de muerte o enfermedad grave con secuelas a largo plazo, el tratamiento al nacer puede proteger a los niños durante este periodo de alto riesgo y/o hasta que tengan la edad suficiente para recibir una vacuna estándar contra la tos ferina. Esto puede ser particularmente importante en el mundo en desarrollo, donde el riesgo de contraer tos ferina es alto, la enfermedad mata entre 160.000 y 300.000 niños anualmente, y los recién nacidos solo ven al médico una vez al nacer.

Se espera que un cóctel de anticuerpos humanizados hu1B7 y hu11E6 (también conocido como SYN-005) proporcione al menos cuatro meses de profilaxis debido a su semivida plasmática y potencia.

La semivida de SYN-005 se estima en base a los datos farmacocinéticos (PK) obtenidos de los estudios en babuinos junto con los datos disponibles para otros anticuerpos administrados como tratamientos profilácticos a los recién nacidos. Específicamente, se demostró que SYN-005 tiene una semivida beta en babuinos de 11 días.

La potencia de SYN-005 se evaluó frente al estándar de suero policlonal de la Organización Mundial de la Salud (OMS) utilizado habitualmente para predecir la eficacia de la vacuna. La potencia de la OMS se cuantifica en unidades equivalentes (UE), y 5 UE/ml se considera un nivel protector en seres humanos. Véase Storsaeter J. et al. (1998), *Vaccine*, 16(20):1907-16. Específicamente, se determinó que la potencia de SYN-005 era de 2 UE/ug. Además, en un ensayo funcional de células CHO, se demostró que una UE de SYN-005 es aproximadamente siete veces más potente que una UE del estándar policlonal de la OMS. Particularmente, los dos anticuerpos humanizados en SYN-005 fueron capaces de neutralizar la toxina pertussis, mientras que muchos de los anticuerpos de unión a PTx en un entorno policlonal no interferirán con la función de la toxina pertussis.

Por consiguiente, se espera que el nivel de plasma protector del cóctel SYN-005 sea superior a 5 UE/ml. Específicamente, se espera que una dosis intramuscular de 40 mg/kg de SYN-005 proporcione un nivel sérico de 100-130 ug/ml al mes y 5 ug/ml a los cuatro meses. Dado que SYN-005 tiene una potencia de 2 UE/ug, un nivel sérico de 5 ug/ml es equivalente a 10 UE/ml, el doble del nivel requerido por el estándar de la OMS para tratamientos profilácticos. Además, la observación de que una UE de SYN-005 es siete veces más potente que una UE del estándar policlonal de la OMS proporciona un margen adicional para garantizar la profilaxis continua a los cuatro meses.

En conjunto, estos datos sugieren que una dosis única de SYN-005 mantendrá los niveles plasmáticos por encima del umbral requerido para proteger a los recién nacidos de la tos ferina durante al menos cuatro meses.

Como se usa en el presente documento, todos los encabezados tienen simplemente un fin organizativo y no pretenden limitar la divulgación de ninguna manera. El contenido de cualquier sección individual puede ser igualmente aplicable a todas las secciones.

55 **EQUIVALENTES**

Las realizaciones anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitar la invención descrita en el presente documento, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

60

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Board of Regents, The University of Texas System
 Synthetic Biologics, Inc.
 5 Maynard, Jennifer
 Nguyen, Annalee
 Padlan, Eduardo
- <120> ANTICUERPOS DE TOS FERINA HUMANIZADOS Y USOS DE LOS MISMOS
 10 <130> T9333-522001WO
- <150> US 62/046.403
 <151> 05-09-2014
 15 <150> US 61/973.141
 <151> 31-03-2014
- <160> 24
 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
 <211> 118
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Polipéptido sintético
 30 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Phe Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asp Glu Lys Phe
 50 55 60
 Asn Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Trp Leu Ser Gly Ala Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 35 <211> 118

ES 2 755 957 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Polipéptido sintético

<400> 2
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Asn Ser Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 3
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 3
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

ES 2 755 957 T3

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

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4

<211> 118

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 4

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5

15 <211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

ES 2 755 957 T3

<400> 5

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

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

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

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

Asn Ser Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 6

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

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

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

ES 2 755 957 T3

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

Asn Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 7

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8

15 <211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

<400> 8

ES 2 755 957 T3

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 9

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 9

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

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

15 <210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 755 957 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 10

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ile Val Ser Phe Leu
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Ala Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 11

<211> 106

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 11

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

Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

ES 2 755 957 T3

<210> 12

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 12

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Met
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Pro Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13

<211> 123

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 13

ES 2 755 957 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 14

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Val Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ser

ES 2 755 957 T3

50

55

60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 15

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 15

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Val Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 16

15 <211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

ES 2 755 957 T3

<400> 16

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Val Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ala Ala
50 55 60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 17

5 <211> 123

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 17

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Val Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Phe Ser Ser

ES 2 755 957 T3

50

55

60

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 18

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 18

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

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

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

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Ser Tyr Tyr Gly Arg Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110

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

<210> 19

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

ES 2 755 957 T3

<400> 19

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp Gln
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 20

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Polipéptido sintético

<400> 20

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

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

15

<210> 21

<211> 107

ES 2 755 957 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Polipéptido sintético

<400> 21

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
85 90 95

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

10 <210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 22

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

ES 2 755 957 T3

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 23

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 23

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

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

<210> 24

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Polipéptido sintético

ES 2 755 957 T3

<400> 24

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

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

Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Trp
 85 90 95

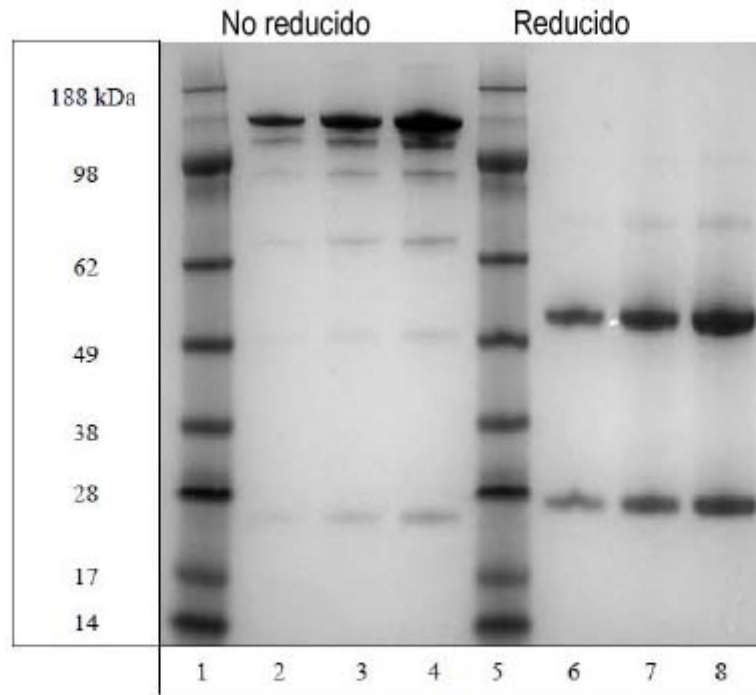
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5

REIVINDICACIONES

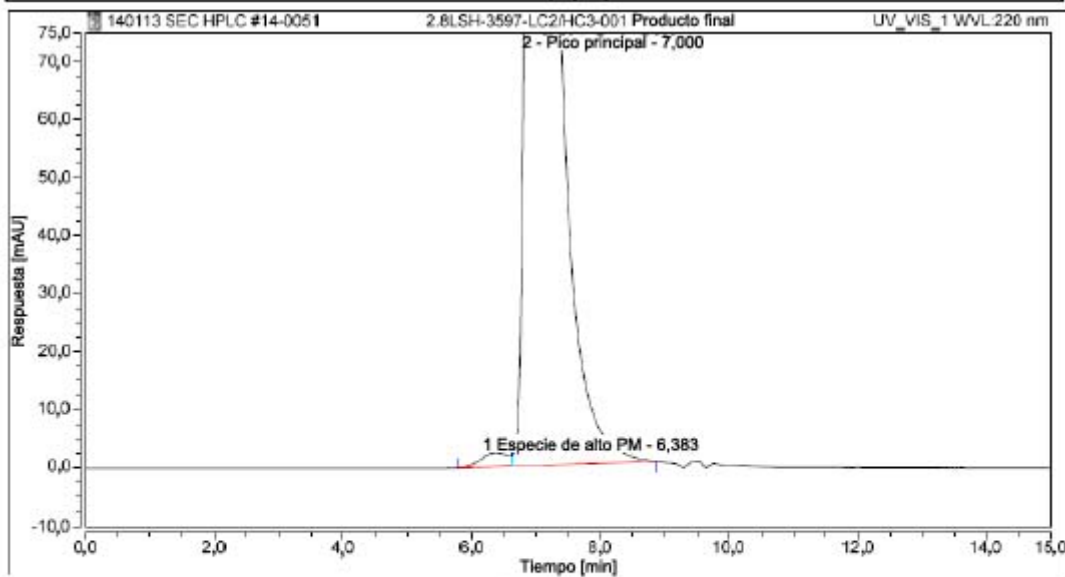
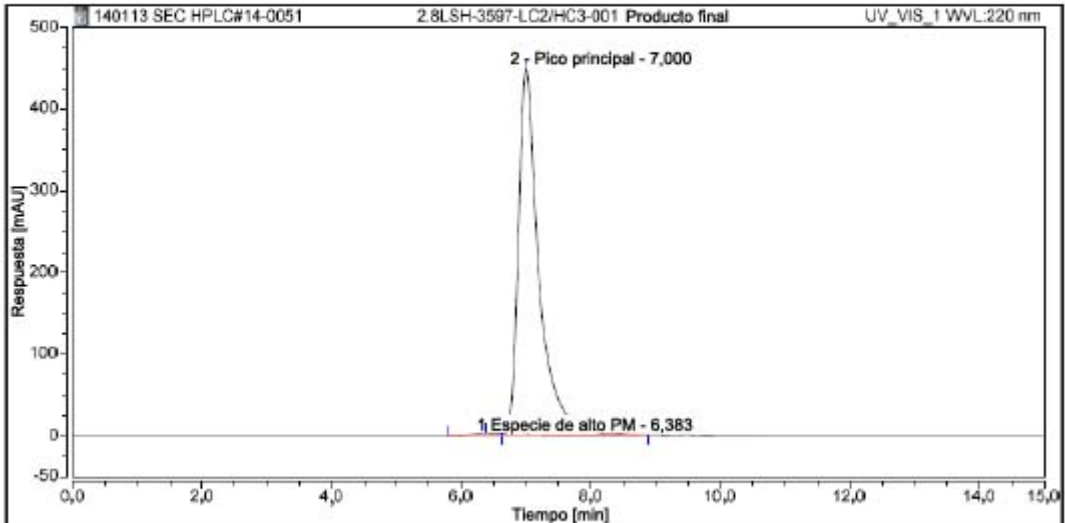
1. Un anticuerpo 1B7 humanizado que se une a una proteína de toxina pertussis, que comprende una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina, 5 donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, donde el anticuerpo se une a la proteína de toxina pertussis con 10 una K_D de 3 nM o menos.
3. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada de inmunoglobulina y una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina de la reivindicación 1. 15
4. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 3.
5. Una célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 4.
- 20 6. Una célula huésped que comprende:
un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina del anticuerpo de la reivindicación 1, donde la región variable de cadena pesada de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y
un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que 25 codifica la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina del anticuerpo de la reivindicación 1, donde la región variable de cadena ligera de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un paciente infectado con Bordetella pertussis, donde se debe administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo 1B7 humanizado de 30 la reivindicación 1.
8. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 7, donde un agente antimicrobiano, seleccionado de azitromicina, claritromicina, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, roxitromicina, cetólidos, ampicilina, amoxicilina, 35 tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, y además se administrarán cefalosporinas.
9. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde el paciente es humano.
10. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 9, donde el ser humano es un bebé.

FIGURA 1



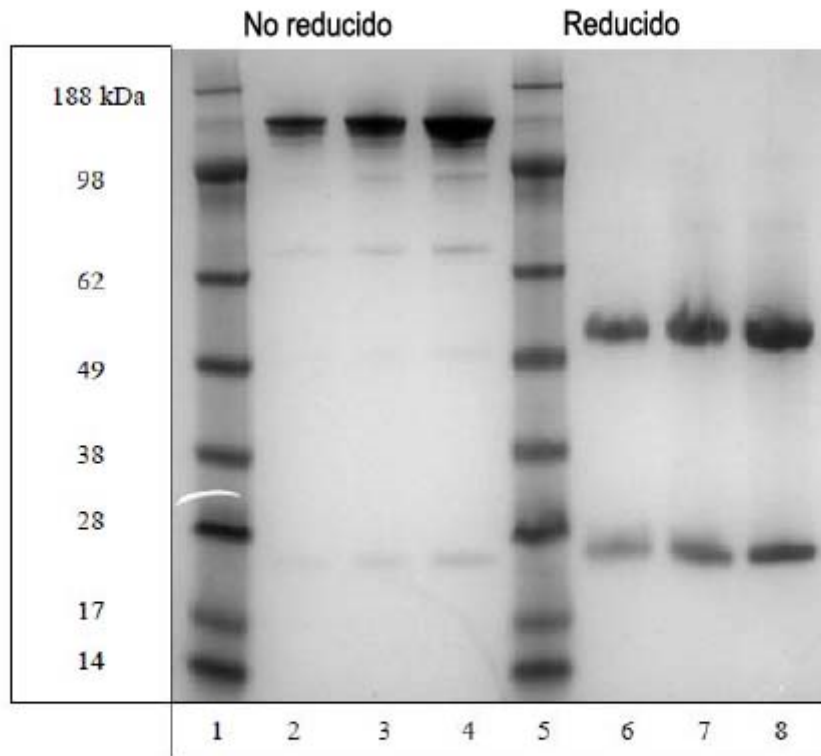
Carril	Descripción de la muestra	Agente reductor (µl)	Muestra (µl)	Agua (µl)	4X LDS (µl)	Cantidad cargada en gel (µl)
1	PM	NA	NA	NA	NA	10
2	3597 - 1 µg	0	2,6	19,9	7,5	10
3	3597 - 2 µg	0	5,2	17,3	7,5	10
4	3597 - 4 µg	0	10,4	12,1	7,5	10
5	PM	NA	NA	NA	NA	10
6	3597 - 1 µg	3	2,6	16,9	7,5	10
7	3597 - 2 µg	3	5,2	14,3	7,5	10
8	3597 - 4 µg	3	10,4	9,1	7,5	10

FIGURA 2



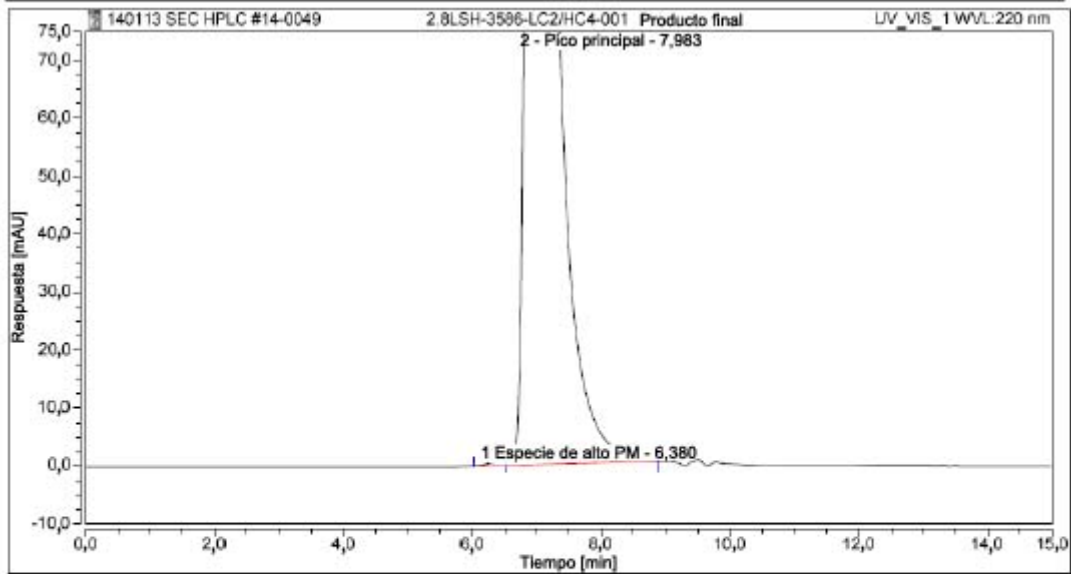
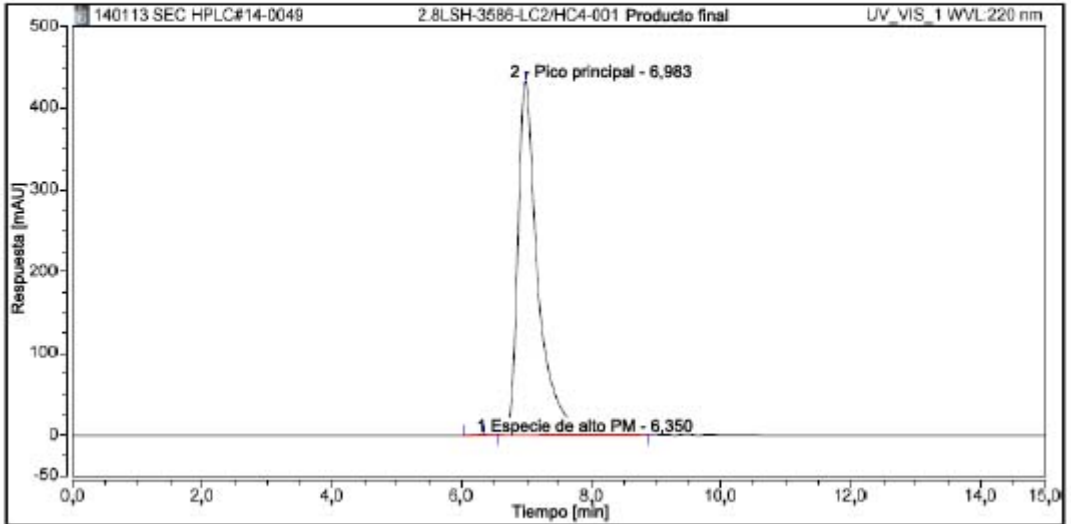
Resultados de integración							
N.º	Nombre del pico	Tiempo de retención min	Peso mAU	Área mAU*min	% de área relativa	Cantidad	Tipo de pico
1	Especie de alto PM	6,383	2,400	1,154	0,70	n.a.	BM
2	Pico principal	7,000	450,401	164,250	99,30	n.a.	MF
0,3.	Especie de bajo PM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Total:			452,800	165,404	100,00	0,00	

FIGURA 3



Carril	Descripción de la muestra	Agente reductor (μl)	Muestra (μl)	Agua (μl)	4X LDS (μl)	Cantidad cargada en gel (μl)
1	PM	NA	NA	NA	NA	10
2	3586 - 1 μg	0	2,7	19,8	7,5	10
3	3586 - 2 μg	0	5,3	17,2	7,5	10
4	3586 - 4 μg	0	10,7	11,8	7,5	10
5	PM	NA	NA	NA	NA	10
6	3586 - 1 μg	3	2,7	16,8	7,5	10
7	3586 - 2 μg	3	5,3	14,2	7,5	10
8	3586 - 4 μg	3	10,7	8,8	7,5	10

FIGURA 4



Resultados de integración							
N.º	Nombre del pico	Tiempo de retención min	Peso mAU	Área mAU*min	% de área relativa	Cantidad	Tipo de pico
1	Especie de alto PM	6,350	0,608	0,210	0,14	n.a.	RM
2	Pico principal	6,983	432,820	155,202	99,86	n.a.	MR
n.a.	Especie de bajo PM	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Total:			433,428	155,413	100,00	0,00	

FIGURA 5

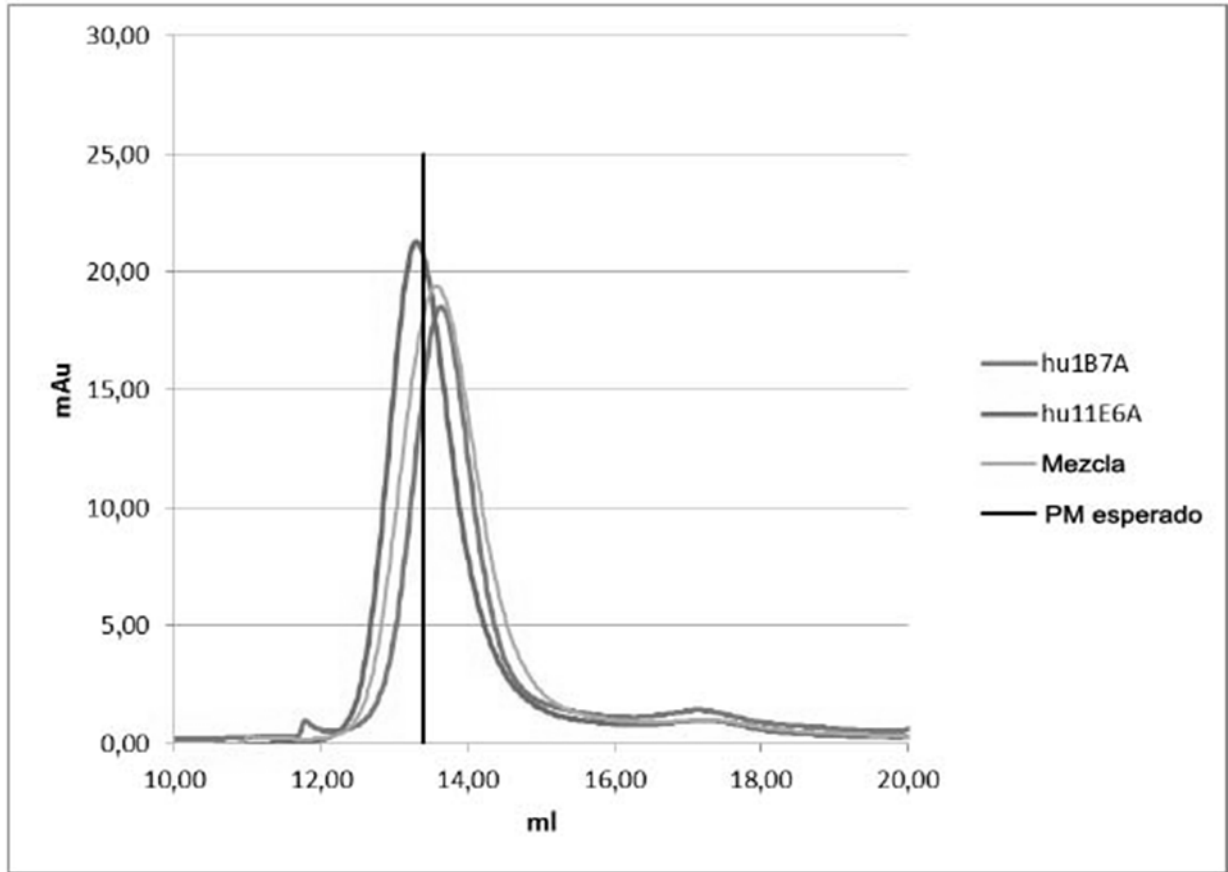


FIGURA 6A-6D

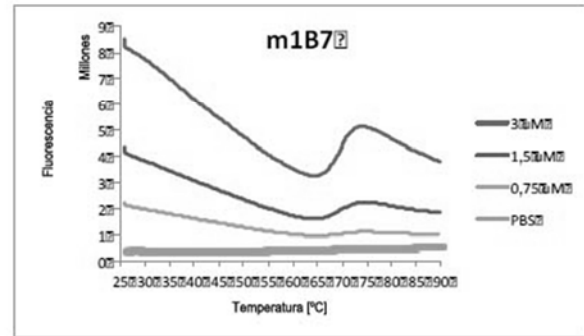
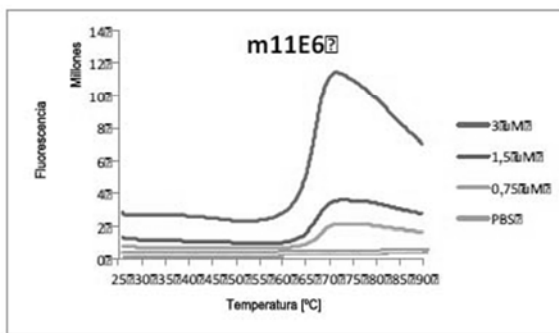
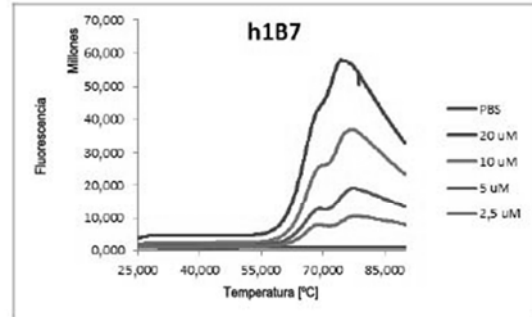
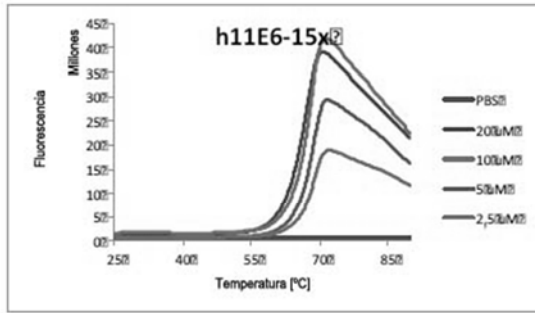


FIGURA 7

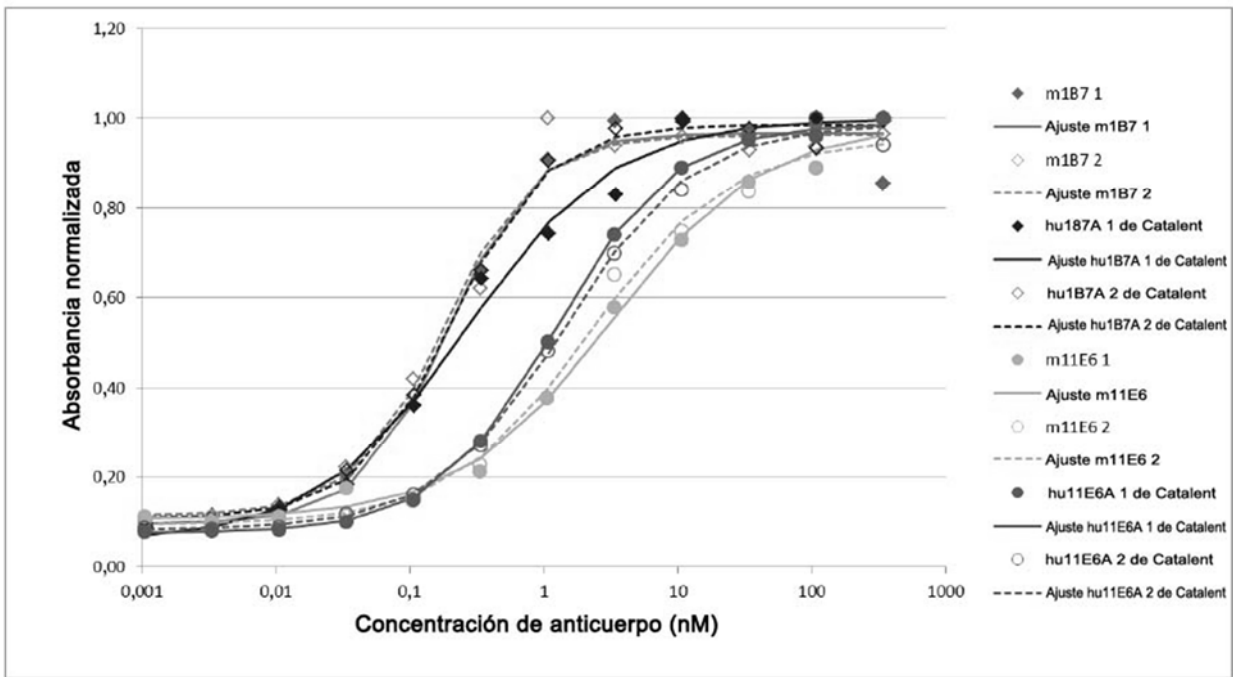


FIGURA 8

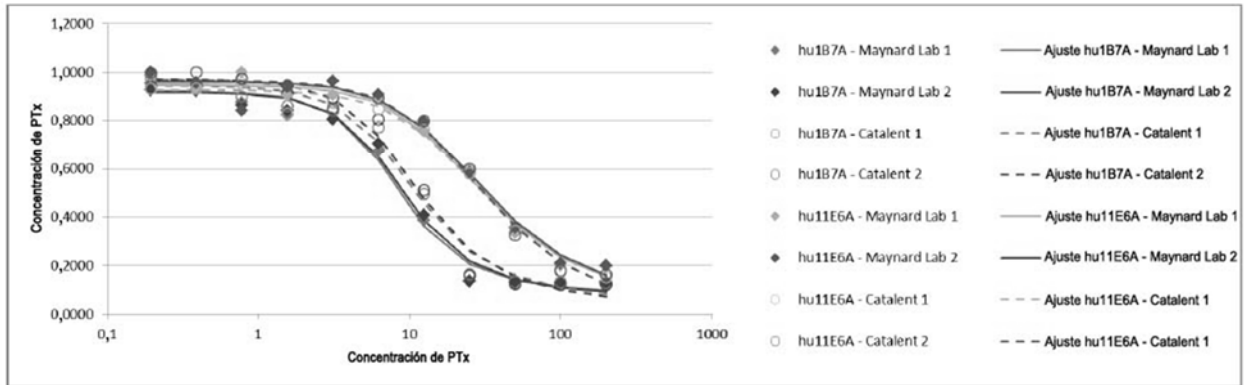


FIGURA 9

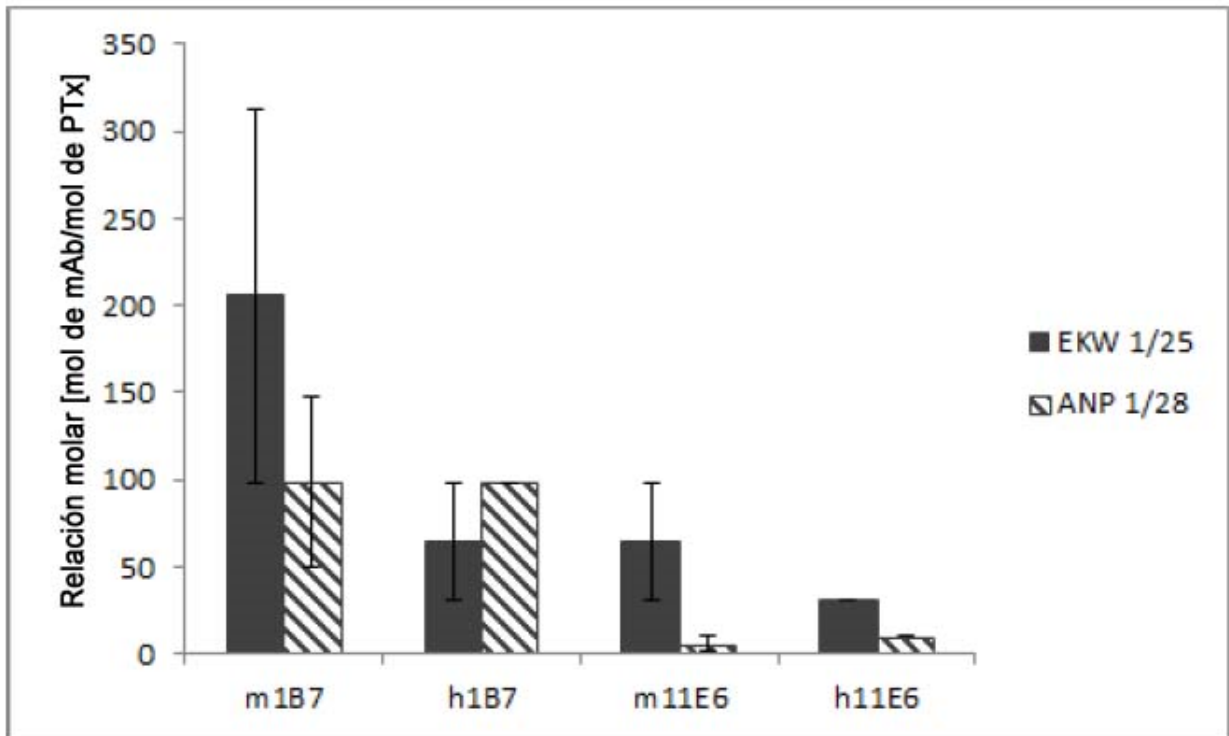


FIGURA 10

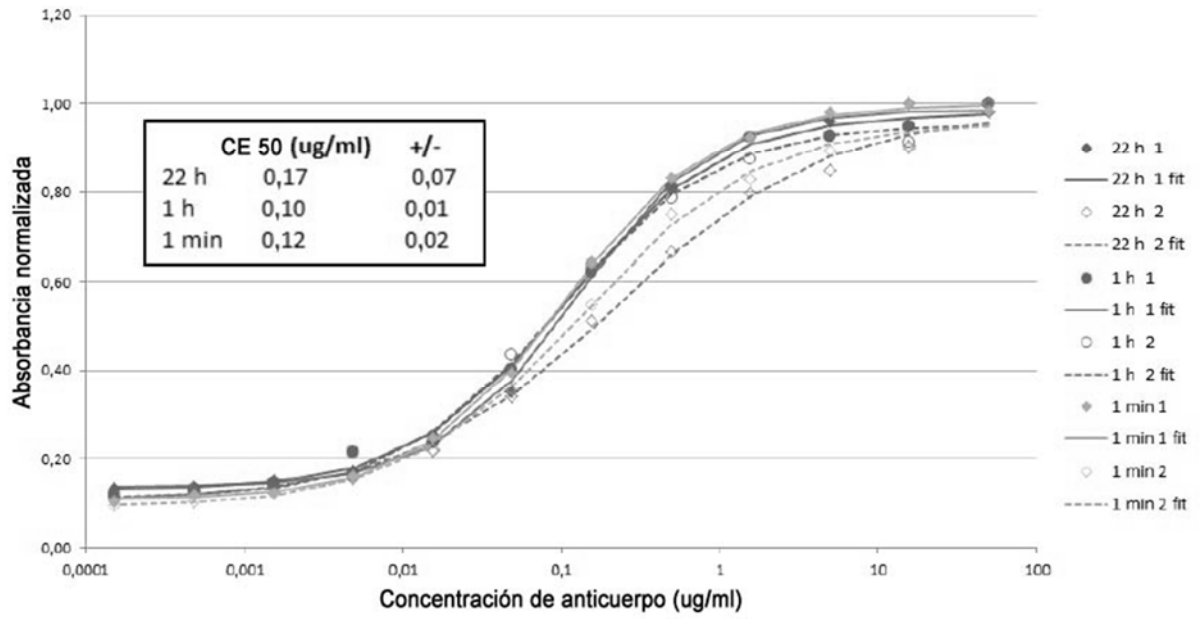


FIGURA 11

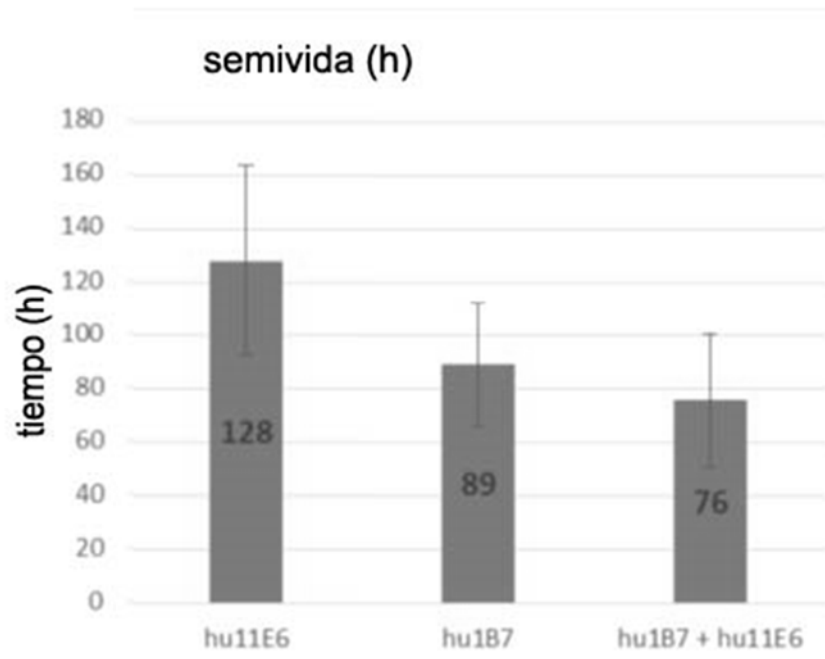


FIGURA 12

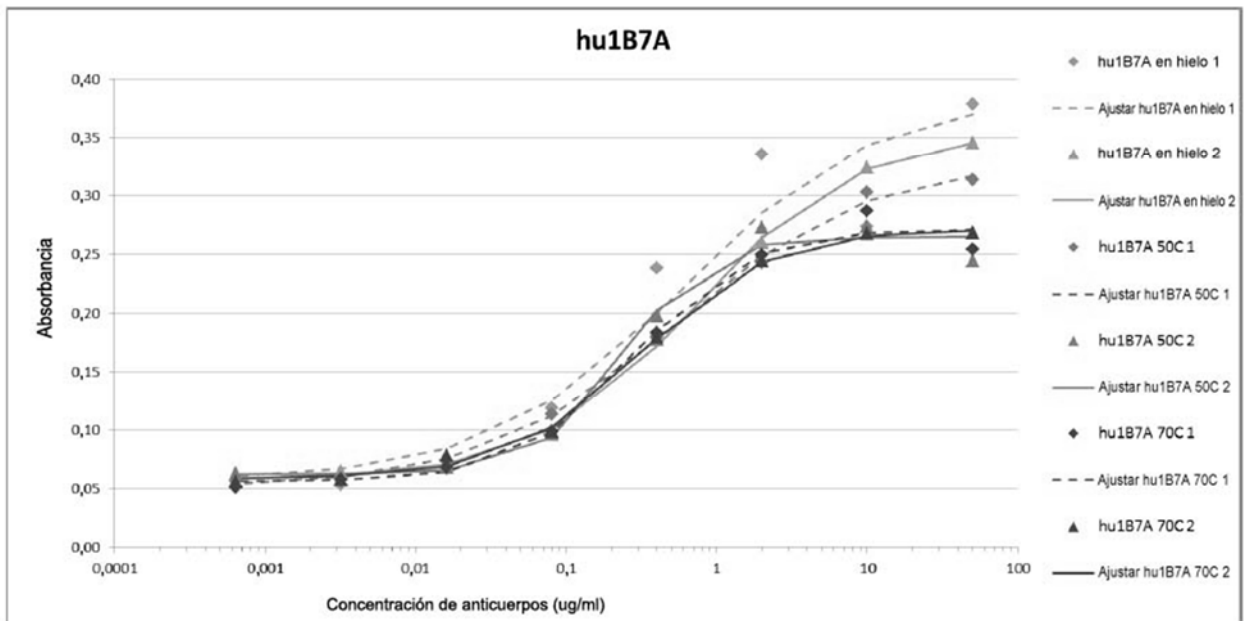


FIGURA 13

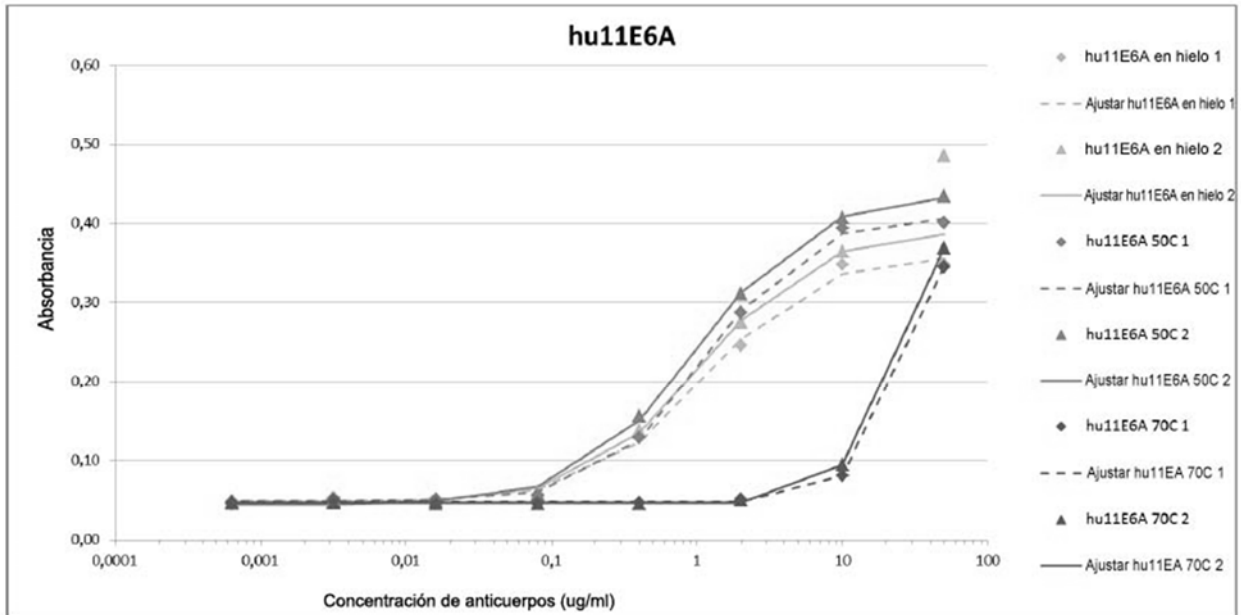


FIGURA 14

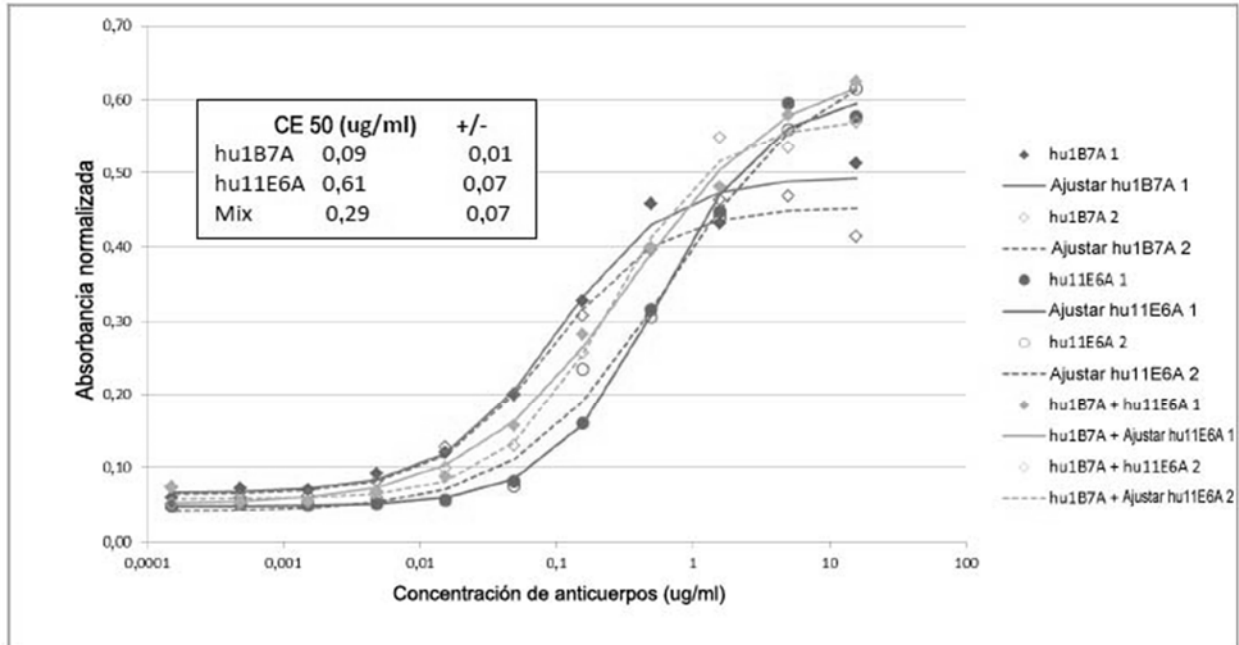
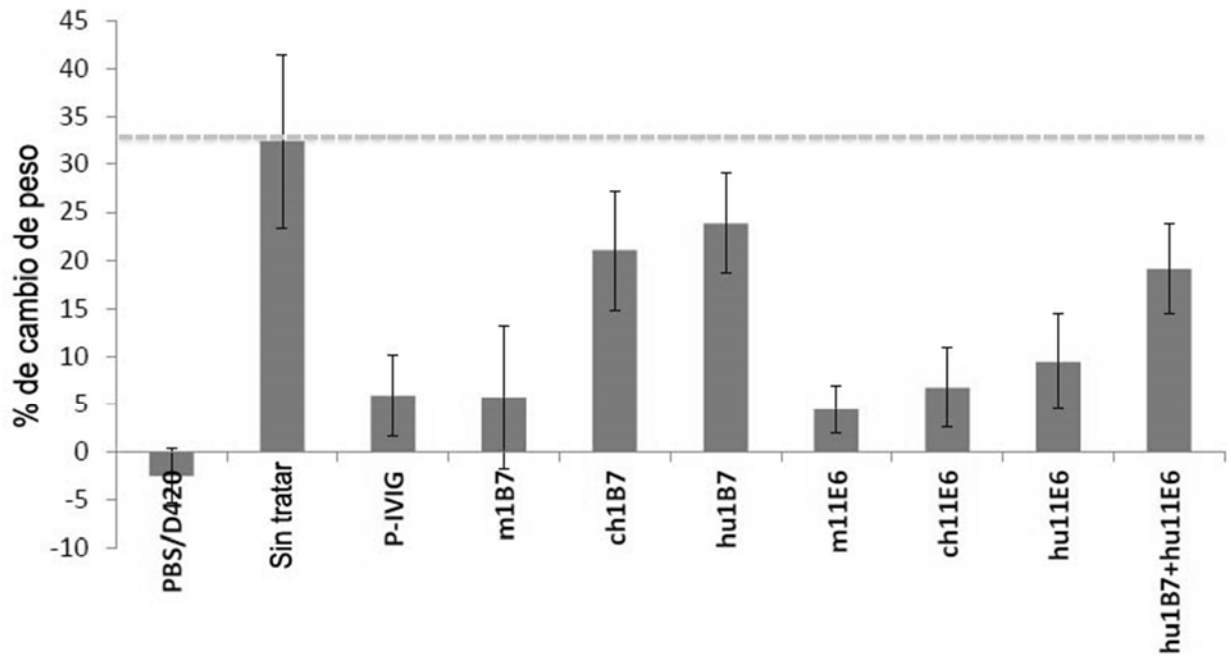


FIGURA 15



FIGURAS 16A Y 16B

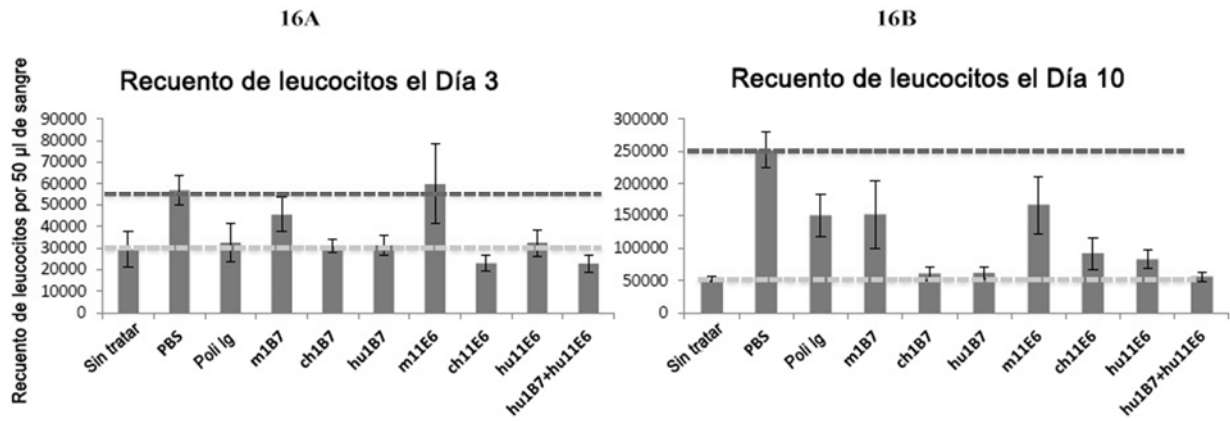
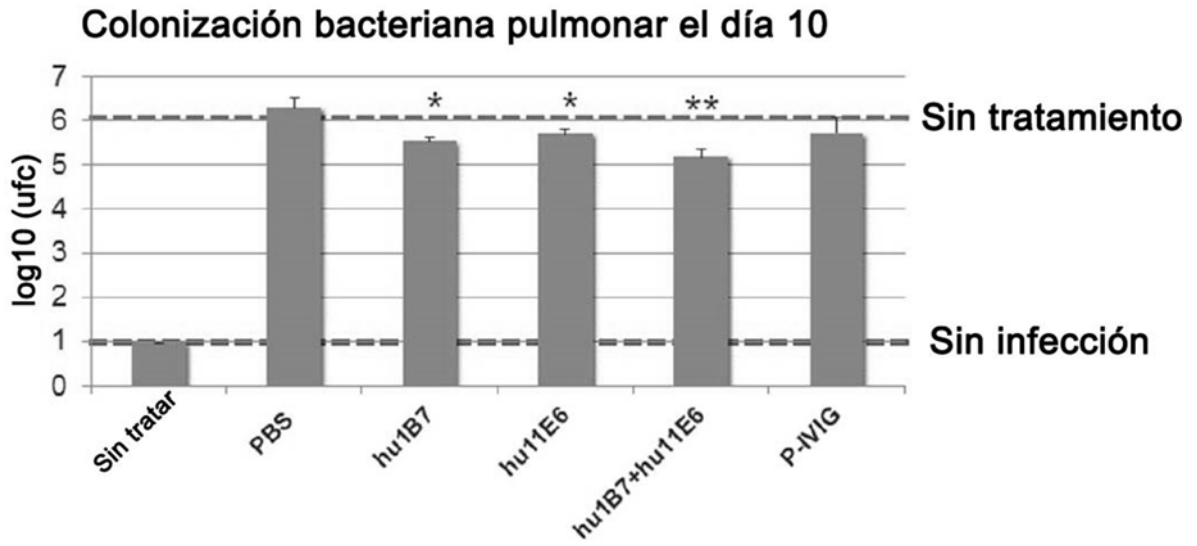


FIGURA 17



FIGURAS 18A Y 18B

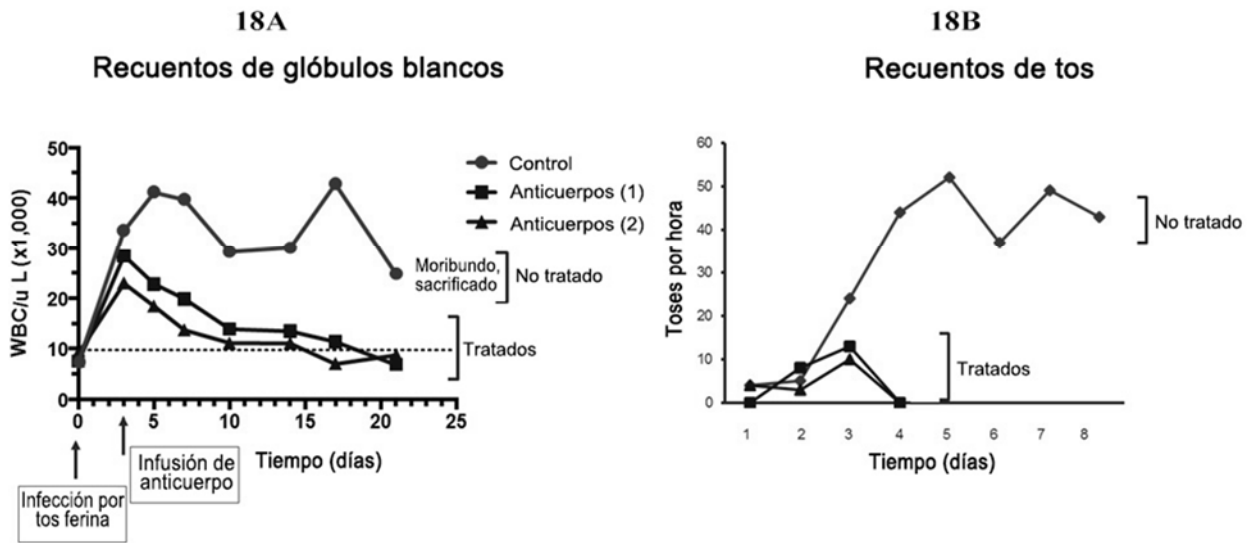
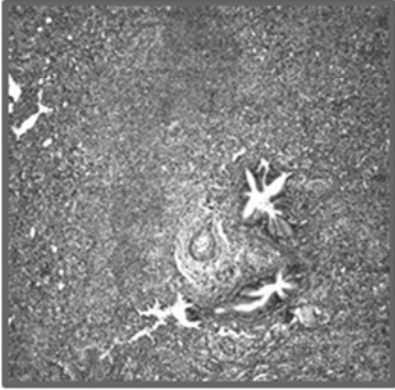
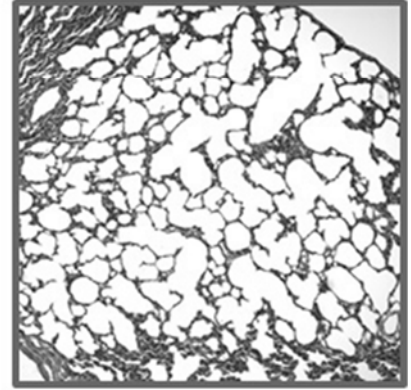
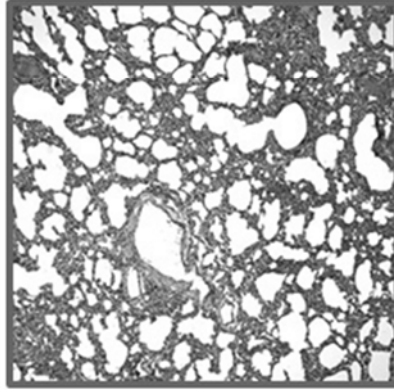


FIGURA 19

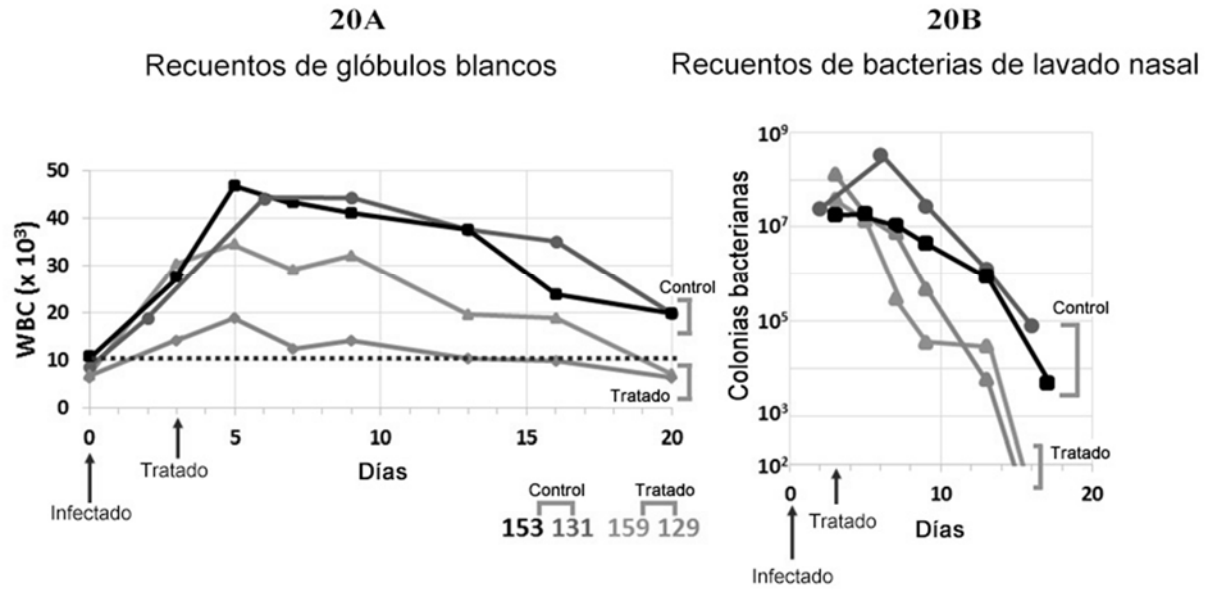
Sin tratar



Tratado con cóctel de anticuerpos



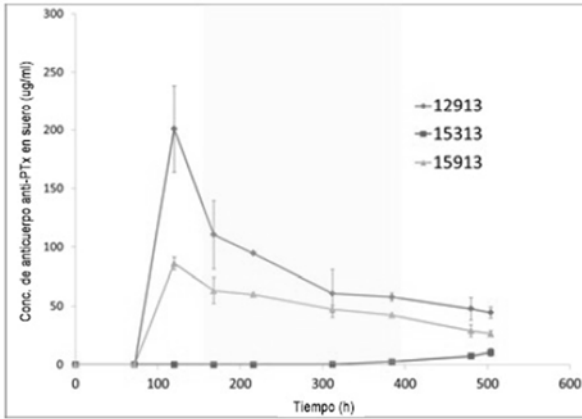
FIGURAS 20A Y 20B



FIGURAS 21A Y 21B

21A

Concentración en suero de anticuerpo



21B

Semivida del anticuerpo

