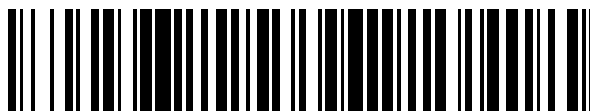


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 508**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2014 PCT/US2014/069409**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15089117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2014 E 14869424 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3079719**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

09.12.2013 US 201361913891 P

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

05.05.2020

73 Titular/es:

**ALLAKOS INC. (100.0%)
975 Island Drive, Suite 201
Redwood City, CA 94065, US**

72 Inventor/es:

**BEBBINGTON, CHRISTOPHER R.;
FALAHATI, RUSTOM;
SOUSA FERNANDES, CAROLINA RITA;
MATTHEWS, DAVID JOHN;
TOMASEVIC, NENAD;
WILLIAMS, JASON y
LEUNG, JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 758 508 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 dirigidos contra Siglec-8 y métodos de uso de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 humana y los métodos de tratar o prevenir una enfermedad mediada por células que expresan Siglec-8.

10 **Antecedentes de la invención**

Siglecs (lectinas análogas a inmunoglobulina de unión a ácido siálico) son proteínas transmembrana de la superficie celular de un único paso que se encuentran predominantemente en leucocitos y que se caracterizan por su especificidad por los ácidos siálicos unidos a gliconjugados de la superficie celular. La familia Siglec contiene al menos 15 miembros que se encuentran en mamíferos (Pillai et al., *Annu Rev Immunol.*, 2012, 30:357-392). Estos miembros incluyen sialoadhesión (Siglec-1), CD22 (Siglec-2), CD33 (Siglec-3), glicoproteína asociada a mielina (Siglec-4), Siglec-5, OBPP1 (Siglec-6), AIRM1 (Siglec-7), SAF-2 (Siglec-8), y CD329 (Siglec-9). Siglec-8, un miembro que se expresa en seres humanos pero no en ratones, se descubrió en primer lugar como parte de los esfuerzos por identificar novedosas proteínas eosinófilas. Además de la expresión en eosinófilos, se expresa también en mastocitos y basófilos. Siglec-8 reconoce un glicano sulfatado, es decir, 6'-sulfo-sialil Lewis X o 6'-sulfo-sialil-N-acetil-S-lactosamina, y contiene un dominio de un motivo inhibidor basado en tirosina inmunorreceptora intracelular (ITIM) que se muestra que inhibe la función de los mastocitos.

Junto con los mastocitos, los eosinófilos pueden promover una respuesta inflamatoria que desempeña papel funcional beneficioso tal como el control de una infección en un sitio de tejido específico. Durante una respuesta inflamatoria, se puede inhibir la apoptosis de los eosinófilos a través de citoquinas promotoras de la supervivencia tal como IL-3 y GM-CSF. Sin embargo, un aumento de eosinófilos activados que no son eliminados rápidamente por la apoptosis puede dar como resultado la liberación de proteínas granulares eosinófilas en sitios ya inflamados que pueden dañar el tejido y producir una inflamación que se va a exacerbar adicionalmente. Se ha mostrado que varias enfermedades están vinculadas a la activación de eosinófilos tales como el síndrome de Churg Strauss, la artritis reumatoide, y el asma alérgica (Wechsler et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2012, 130(3):563-71). Existe actualmente una necesidad de terapias que puedan controlar la actividad de las células inmunitarias implicadas en la inflamación, tal como la actividad de los eosinófilos y los mastocitos.

Estudios anteriores han demostrado que los eosinófilos experimentan la apoptosis cuando Siglec-8 se reticula con anticuerpos de murino específicos sensibilizados contra la porción extracelular de Siglec-8 (Nutku et al., *Blood*, 2003, 336:918-24). Estos anticuerpos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 8,207,305, la patente de Estados Unidos n.º 8.197.811, la patente de Estados Unidos n.º 7.871.612, y la patente de Estados Unidos n.º 7.557.191. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de desarrollar anticuerpos humanizados y dirigidos contra Siglec-8 que reconozcan Siglec-8 humana con alta afinidad y especificidad. El descubrimiento de dichos anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 puede permitir el desarrollo de tratamiento para enfermedades mediadas por la actividad de eosinófilos y/o mastocitos.

Sumario de la invención

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 (incluyendo anticuerpos humanizados y anticuerpos dirigidos contra Siglec-8), las composiciones que los comprenden, y su uso en métodos de terapia.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo humanizado que se une específicamente a una Siglec-8 humana, en el que en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que (i) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos las SEQ ID NO: 16 o 21; o (ii)

(a) la región variable de la cadena pesada comprende:

- (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
- (2) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;
- (3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;
- (4) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
- (5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
- (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y
- (7) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y

(b) la región variable de la cadena ligera comprende:

- (1) una LC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;
- (2) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;
- (3) una LC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;
- (4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
- 5 (5) una LC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o 58;
- (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y
- (7) una LC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

10 En algunos aspectos, la Siglec-8 humana es un dímero. En algunos aspectos, la Siglec-8 humana comprende un dominio extracelular de la Siglec-8 humana fusionado con una región Fc de una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de la IgG1 humana. En algunas realizaciones, la región Fc es una región Fc de la IgG4 humana. En algunos aspectos, la Siglec-8 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74.

15 En algunos aspectos, el anticuerpo humanizado comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16 o 21. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región Fc de cadena pesada que comprende una región Fc de la IgG humana. En realizaciones adicionales, la región Fc de la IgG humana comprende una IgG1 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En algunas realizaciones, la IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, la IgG4 humana comprende la sustitución de aminoácidos S228P, en el que los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice UE como en Kabat. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, el anticuerpo se ha diseñado mediante ingeniería genética para mejorar la actividad de citotoxicidad celular mediada por células dependiente de anticuerpos. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y en el que al menos una de las dos o ambas cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada.

40 En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un anticuerpo aislado que se une a Siglec-8 humana y destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 mediante la actividad ADCC. En algunos aspectos, el anticuerpo destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 *in vitro* (medido, por ejemplo, en un ensayo de cultivo celular como se describe en el Ejemplo 2). En algunos aspectos, el anticuerpo agota los mastocitos que expresan Siglec-8 en un sujeto cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz. En otros aspectos, el anticuerpo agota al menos aproximadamente un 20 % (por ejemplo, al menos de los mastocitos que expresan Siglec-8 en una muestra obtenida del sujeto en comparación con un nivel de valor inicial antes del tratamiento. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la muestra puede ser una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico. En algunos aspectos, la muestra de tejido es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en: piel, pulmonar, médula ósea, y pólipos nasales. En algunos aspectos, la muestra de fluido biológico es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en: sangre, lavado broncoalveolar, y lavado nasal. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para mejorar la actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En algunas realizaciones, al menos una o dos de las cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada. En realizaciones adicionales, el anticuerpo puede producirse en una línea celular que tiene una alfa 1,6-fucosiltransferasa (Fut8) inactivada genéticamente. En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo puede producirse en una línea celular que expresa en exceso β 1,4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III). En realizaciones adicionales, la línea celular expresa en exceso además Golgi μ -manosidasa II (ManII). En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano.

60 En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo humanizado que se une a una Siglec-8 humana, en el que la CE_{50} en los eosinófilos humanos activados que se agotan es menor que la CE_{50} del anticuerpo 2E2 o 2C4 a la Siglec-8 humana. En algunas realizaciones, la CE_{50} del anticuerpo humanizado es aproximadamente un 85 % o menor que la CE_{50} del anticuerpo 2E2 o 2C4 a la Siglec-8 humana. En algunas realizaciones, la CE_{50} del anticuerpo humanizado es aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 0 %.

aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 10 % o aproximadamente el 5 % o menos que la CE₅₀ del anticuerpo 2E2 o 2C4 contra la Siglec-8 humana. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, la IgG4 humana comprende la sustitución de aminoácidos S228P, en el que los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice UE como en Kabat. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo descrito anteriormente y en el presente documento. En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento un vector que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento. En una realización, el vector es un vector de expresión. En otro aspecto más, se proporciona en el presente documento una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula hospedadora expresa y produce el anticuerpo.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende uno o más ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo descrito en el presente documento bajo una condición que produce el anticuerpo. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar el anticuerpo producido por la célula hospedadora. Se proporciona también en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 producido mediante el método. Se proporciona también en el presente documento un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito anteriormente y en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a Siglec-8 humana, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos vinculadas con la región Fc, en el que menos del 50 % de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos en la composición contienen un resto de fucosa. En algunos aspectos, prácticamente ninguna de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos contienen un resto de fucosa. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2-10; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16-22. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 67 -70; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 11-14; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 23 -24. En algunos aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2-14; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16-24. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la afinidad de unión y/o la avidéz de unión del anticuerpo a una Siglec-8 humana puede ser mayor que la afinidad de unión y/o la avidéz de unión del anticuerpo 2E2 o 2C4 a la Siglec-8 humana. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede tener una T_m de al menos aproximadamente 70 °C a al menos aproximadamente 72 °C en un ensayo de desplazamiento térmico. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una T_m de aproximadamente 70 °C, aproximadamente 71 °C, o aproximadamente 72 °C. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene una T_m igual o mayor en comparación con un anticuerpo 2C4 quimérico. En algunos aspectos, el anticuerpo tiene la T_m igual o mayor en comparación con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 85.

Se describe también en el presente documento un método para tratar o prevenir una enfermedad mediada por células que expresan Siglec-8 en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo descrito en el presente documento o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una composición descrita en el presente documento. En algunos aspectos, la enfermedad es una enfermedad mediada por eosinófilos. En algunos aspectos, la enfermedad es una enfermedad mediada por mastocitos. En algunos aspectos, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en asma, rinitis alérgica, poliposis nasal, dermatitis atópica, urticaria crónica, mastocitosis, leucemia eosinófila, y síndrome hipereosinófilo. En algunos aspectos, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en asma pauci-granulocítica, hipersensibilidad de las vías aéreas aguda o crónica, esofagitis eosinófila, síndrome de Churg-Strauss, inflamación asociada con una citoquina, inflamación asociada con células que expresan Siglec-8, neoplasia asociada con células que expresan Siglec-8, urticaria física, urticaria por frío, urticaria por presión, penfigoide ampolloso, alergia alimentaria, y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). En algunos aspectos, el anticuerpo inhibe uno o más síntomas de una reacción alérgica. En algunos aspectos, la reacción alérgica es una reacción de hipersensibilidad de Tipo I. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el sujeto puede padecer asma que no está adecuadamente controlado por un corticoesteroide inhalado, un agonista β_2 de acción corta, un agonista β_2 de acción prolongada, o una combinación de los mismos.

Se describe también en el presente documento un método para agotar los mastocitos que expresan Siglec-8 en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a Siglec-8 humana, en el que el anticuerpo destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 mediante actividad ADCC. En algunos aspectos, el anticuerpo destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 *in vitro* (medido, por ejemplo, en un ensayo de cultivo celular como se describe en el Ejemplo 2). En algunos aspectos, el anticuerpo agota al menos aproximadamente un 20 % de los mastocitos que expresan Siglec-8 en una muestra obtenida del sujeto en comparación con un nivel de valor inicial antes del tratamiento. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, la muestra puede ser una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico. En algunos aspectos, la muestra de tejido es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en: piel, pulmonar, médula ósea, y pólipos nasales. En algunos aspectos, la muestra de fluido biológico es una o más seleccionadas entre el grupo que consiste en: sangre, lavado broncoalveolar, y lavado nasal. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para mejorar la actividad de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender dos cadenas pesadas y en el que al menos una de las dos o ambas cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada. En aspectos adicionales, el anticuerpo puede producirse en una línea celular que tiene una alfa 1,6-fucosiltransferasa (Fut8) inactivada genéticamente. En algunas realizaciones adicionales, el anticuerpo puede producirse en una línea celular que expresa en exceso β 1,4-N-acetilglucosiniltransferasa III (GnT-III). En aspectos adicionales, la línea celular expresa en exceso además Golgi μ -manosidasa II (ManII). En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 106; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 109. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 110. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En un aspecto adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 108; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región

variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 67 -70; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el sujeto tiene una enfermedad mediada por células que expresan Siglec-8. En algunos aspectos, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en asma, rinitis alérgica, poliposis nasal, dermatitis atópica, urticaria crónica, mastocitosis, leucemia eosinófila, y síndrome hipereosinófilo. En algunos aspectos, la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en asma pauci-granulocítica, hipersensibilidad de las vías aéreas aguda o crónica, esofagitis eosinófila, síndrome de Churg-Strauss, inflamación asociada con una citoquina, inflamación asociada con células que expresan Siglec-8, neoplasia asociada con células que expresan Siglec-8, urticaria física, urticaria por frío, urticaria por presión, penfigoide ampolloso, alergia alimentaria, y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). En algunos aspectos, el anticuerpo inhibe uno o más síntomas de una reacción alérgica. En algunos aspectos, la reacción alérgica es una reacción de hipersensibilidad de Tipo I. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el sujeto puede padecer asma que no está adecuadamente controlado por un corticoesteroide inhalado, un agonista $\beta 2$ de acción corta, un agonista $\beta 2$ de acción prolongada, o una combinación de los mismos. En cualquiera de los aspectos en el presente documento, el sujeto puede ser un ser humano.

debe entenderse que una, alguna, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia. Estas y otras realizaciones de la invención se describirán además mediante la siguiente descripción detallada. La invención se define por las reivindicaciones y cualesquiera otros aspectos o realizaciones que se muestran en el siguiente documento que no se encuentran comprendidos en el alcance de las reivindicaciones son únicamente a título informativo.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** es un alineamiento de secuencias que muestra la comparación de las secuencias de cadena pesada de anticuerpos humanizados. Los restos marco dentro de los 4Å de las CDR en el modelo molecular del anticuerpo 2E2 de ratón están representados por a *; los restos dentro de los 4Å de las CDR y los restos VCI que eran diferentes en el marco aceptor humano están resaltados con ^, Las retromutaciones de estos restos en el marco aceptor humano en ratón están indicadas por @; Las mutaciones somáticas de la línea germinal humana están indicadas por °; si aquellos restos eran diferentes del AF471521 FW y mou2E2 (es decir, 2E2 de ratón) o diferentes del marco AF471521 e idénticas al mou2E2 (es decir, el 2E2 de ratón) los restos correspondientes en el marco aceptor humano se retromutaron a la línea germinal humana y se indican mediante +. Las secuencias resaltadas en la versión 2 de la cadena pesada representan un injerto directo de los CDR de mou2E2 (es decir, 2E2 de ratón) en la familia de la línea germinal humana más cercana (es decir, la secuencia de la línea germinal más cercana). m2E2 VH corresponde a la SEQ ID NO: 1; FW AF471521 humana corresponde a la SEQ ID NO: 120; La línea germinal X92218 VH366 corresponde a la SEQ ID NO: 121; 2E2 RHA corresponde a la SEQ ID NO: 2; 2E2 RHB corresponde a la SEQ ID NO: 3; 2E2 RHC corresponde a la SEQ ID NO: 4; 2E2 RHD corresponde a la SEQ ID NO: 5; 2E2 RHE corresponde a la SEQ ID NO: 6; 2E2 RHF corresponde a la SEQ ID NO: 7; 2E2 RHG corresponde a la SEQ ID NO: 8; IGHV4-59 FW corresponde a la SEQ ID NO: 122; 2E2 RHA2 corresponde a la SEQ ID NO: 9; y 2E2 RHB2 corresponde a la SEQ ID NO: 10.

La **FIG. 2** es un alineamiento de secuencias que muestra la comparación de las secuencias de cadena ligera de los anticuerpos humanizados. Los restos marco dentro de los 4Å de las CDR en el modelo molecular del anticuerpo 2E2 de ratón están representados por a *; los restos dentro de los 4Å de las CDR y los restos VCI que son diferentes en el marco aceptor humano se indican mediante +; Las retromutaciones de estos restos en el FW humano en ratón están indicadas por @; la retromutación de la línea germinal humana de los restos que en el marco X93721 son diferentes de los de ratón están indicados por #. m2E2 VK corresponde a la SEQ ID NO: 15; X93721 corresponde a la SEQ ID NO: 123; La línea germinal X01668 corresponde a la SEQ ID NO: 124; m2E2 RKA corresponde a la SEQ ID NO: 16; m2E2 RKB corresponde a la SEQ ID NO: 17; m2E2 RKC corresponde a la SEQ ID NO: 18; m2E2 RKD corresponde a la SEQ ID NO: 19; m2E2 RKE corresponde a la SEQ ID NO: 20; m2E2 RKF corresponde a la SEQ ID NO: 21; y m2E2 RKG corresponde a la SEQ ID NO: 22.

La **FIG. 3** es un alineamiento de secuencias que muestra la comparación de las secuencias de la CDR que estaban mutadas en las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos humanizados. Los restos de la CDR que estaban mutados en la variante que eran más cercanos a la secuencia de la línea germinal están indicados por #. 2E2 RKA corresponde a la SEQ ID NO: 16; 2E2 RKF corresponde a la SEQ ID NO: 21; 2E2 RKA F-Y mut corresponde a la SEQ ID NO: 23; 2E2 RKF F-Y mut corresponde a la SEQ ID NO: 24; 2E2 RHA corresponde a la SEQ ID NO: 2; 2E2 RHE corresponde a la SEQ ID NO: 6; 2E2 RHE S-G mut corresponde a la SEQ ID NO: 11; 2E2 RHE E-D mut

corresponde a la SEQ ID NO: 12; 2E2 RHE Y-V mut corresponde a la SEQ ID NO: 13; y 2E2 RHE E-D triple mut corresponde a la SEQ ID NO: 14.

La **FIG. 4** es un gráfico que muestra una comparación de la unión del antígeno de Siglec-8 por anticuerpos candidatos purificados codificados por 2C4 quiméricos o las combinaciones de 2E2 RHE con 2E2 RKA, 2E2 RKF, 2E2 RKA CDR3 mutante, o 2E2 RKF CDR3 mutante, se calentaron durante 10 min a la temperatura indicada, a continuación se enfriaron a 4 °C antes de llevar a cabo el ELISA de unión a Siglec-8.

La **FIG. 5** es un gráfico que muestra la Tm de los anticuerpos candidatos 2C4 purificados en comparación con ch2C4 (es decir, anticuerpo 2C4 quimérico).

La **FIG. 6** es un gráfico que muestra la estabilidad de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 quiméricos y humanizados tras congelarse a -20 °C durante 60 minutos y descongelarse a temperatura ambiente.

La **FIG. 7** es un gráfico que muestra la destrucción de eosinófilos con anticuerpos dirigidos contra Siglec-8. Se incubaron leucocitos totales de sangre periférica en presencia de concentraciones de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 y anticuerpos del control durante 16 horas. Se vigiló la reducción del número de eosinófilos mediante citometría de flujo y se cuantificó como una pérdida de células IL5Rα+ negativas para CD16 con alta dispersión lateral (SSC^{HL}).

La **FIG. 8** es una serie de gráficos que muestran la apoptosis *in vitro* y el agotamiento *in vivo* de mastocitos humanos mediante los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8. **FIG. 8A.** Actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos mediados por linfocitos NK (ADCC) del anticuerpo IgG4 HEKA, el anticuerpo IgG1 HEKA no fucosilado y los anticuerpos IgG1 1H10 quiméricos a baja concentración de fucosa en mastocitos humanos primarios procedentes del lavado peritoneal de ratones NSGS se injertaron con hemocitoblastos humanos como se demostró por la liberación de LDH a las 48 horas. El control indica un anticuerpo con isotipo IgG1 humano que no se une a Siglec-8. **LaFIG. 8B** Agotamiento de mastocitos positivos para Siglec-8 *in vivo*. Ratones Siglec-8 transgénicos que expresan selectivamente Siglec-8 sobre la superficie de mastocitos a niveles comparables a aquellos en mastocitos humanos se trataron intraperitonealmente con anticuerpo IgG4 HEKA, anticuerpo IgG1 HEKA no fucosilado, anticuerpo 1c3 de murino, o un anticuerpo del control con isotipo IgG4 humano que no se une a Siglec-8. n = 4 ratones por grupo.

La **FIG. 9** es un gráfico que muestra la inhibición de una reacción de hipersensibilidad de Tipo I en ratones humanizados mediante un anticuerpo IgG4 humanizado dirigido contra Siglec-8. Se indujo la respuesta anafiláctica cutánea pasiva en los oídos de ratones NSGS injertados mediante sensibilización con una IgE dirigida contra NP (administrada en el oído derecho) o el control de PBS (administrado en el oído izquierdo) y NP-BSA administrado 24 horas después de la última sensibilización. Se trataron los ratones con IgG4 HEKA o anticuerpo del control con isotipo IgG4 humano que no se une a Siglec-8 tanto 24 horas antes de la sensibilización tal como se indica por * como 2 horas después de la sensibilización tal como se indica por @. Se muestran el cambio medio en el grosor del oído y los errores estándar a las 3 horas o las 24 horas después del estímulo, n = 5 ratones por grupo para los ratones tratados con el anticuerpo IgG4 HEKA y n = 4 ratones por grupo para los ratones tratados con el anticuerpo isotipo del control.

La**FIG. 10** es una serie de histogramas que muestra la unión de los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra Siglec-8 2E2, 1C3, y 1H10 de eosinófilos de babuino y ser humano (células CD49⁺CD16⁻SSC^{alta}) como se demuestra mediante citometría de flujo. Los histogramas muestran numerosos eosinófilos de babuino o ser humano representados gráficamente frente a la intensidad de la fluorescencia para cada anticuerpo en comparación con un anticuerpo del control con isotipo IgG1 de ratón que no se une a Siglec-8.

Descripción detallada

I. Definiciones.

Antes de describir la invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no está limitada a composiciones o sistemas biológicos concretos, que pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento es únicamente con el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea una limitación. Tal como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la", incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una molécula" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichas moléculas y similares.

El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un intervalo usual de error para el valor respectivo fácilmente conocido por la persona experta en este campo técnico. La referencia de "aproximadamente" a un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro por se.

Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

El término "anticuerpo" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de la inmunoglobulina, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv). El término "inmunoglobulina"

(Ig) se usa de forma indistinta con "anticuerpo" en el presente documento.

La unidad básica de anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetrámera compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden entre 2-5 de las 4 unidades de cadena básicas que pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas tiene generalmente aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del tipo de isotipo de cadena H. Cada cadena H y L tienen también puentes disulfuro intracadena separados regularmente. Cada cadena H tiene en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido por tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada L tiene en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido por un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que restos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de V_H y V_L forman juntos un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8ª Edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basándose en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H , por ejemplo, las humanas expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los anticuerpos IgG1 pueden existir en múltiples variantes polimórficas denominadas alotipos (revisados en Jefferis y Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Tema 4 1-7) cualquiera de los cuales son adecuados para su uso en la invención. Las variantes alotípicas comunes en poblaciones humanas son aquellas designadas por las letras a, f, n, z.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno de producción (por ejemplo, de forma natural o recombinante). En algunas realizaciones, el polipéptido aislado está exento de asociación con todos los componentes diferentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los resultantes de las células transfectadas recombinantes, son materiales que interferirían normalmente con la investigación, usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En algunas realizaciones, el polipéptido está purificado: (1) en más de un 95 % en peso de anticuerpo según se determinó mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, en más de un 99 % en peso; (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia del extremo N o la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o sin reducción utilizando tinción con azul de Coomassie, o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes debido al menos a que un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. De forma ordinaria, sin embargo, un polipéptido o anticuerpo aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto para posibles mutaciones de origen natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales tienen una escisión en el extremo C en la cadena pesada y/o la cadena ligera. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 restos de aminoácidos se escinden en el extremo C de la cadena pesada y/o la cadena ligera. En algunas realizaciones, la escisión del extremo C elimina una lisina en el extremo C de la cadena pesada. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales tienen una escisión en el extremo N y la cadena pesada y/o la cadena ligera. Por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 restos de aminoácidos se escinden en el extremo N de la cadena pesada y/o la cadena ligera. En algunas realizaciones, las formas truncadas de anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante técnicas recombinantes. En algunas realizaciones, Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. En algunas realizaciones, Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, se dirigen contra múltiples sitios antigénicos (tales como un anticuerpo específico o un anticuerpo multiespecífico). El modificador "monoclonal" indica la naturaleza del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar a partir de varias técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, tecnologías de expresión en fagos, y tecnologías para producir anticuerpos humanos o análogos a humanos en animales que tienen partes o todos los loci o genes de la inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana.

La expresión "anticuerpo puro" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado a un resto citotóxico o radiomarca.

Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" o "anticuerpo completo" se usan de manera indistinta para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, al contrario que un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos específicamente completos incluyen aquellos con cadenas pesada y ligera que incluyen una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencias naturales (por ejemplo, dominios constantes de secuencias naturales humanas) o las secuencias variantes de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, Un anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, la unión del antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo proporciona un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde groseramente a dos fragmentos Fab unidos mediante disulfuro que tienen diferente actividad de unión a antígeno y siguen siendo capaces de reticular el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} incluyendo una o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el(los) resto(s) cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos del anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones del extremo carboxi de ambas cadenas H que se mantienen juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, la región que está reconocida también por los receptores Fc (FcR) que se encuentran en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de la cadena pesada y de región variable de la cadena ligera, en una asociación no covalente intensa. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles en cada una de las cadenas H y F) que aportan los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y que transmiten al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

"Fv monocatenario", abreviado también como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo vinculados a una única cadena polipeptídica. En algunas realizaciones, el polipéptido sFv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión del sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

"Fragmentos funcionales" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que incluyen generalmente la unión al antígeno o la región variable del anticuerpo intacto o la región Fv de un anticuerpo que retiene o tiene modificada la capacidad de unirse a FcR. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que la cadena o cadenas restantes son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva del anticuerpo procedente de un anticuerpo producido por, por ejemplo, monos macaco inmunizados con un antígeno de interés. Tal como se utiliza en el presente documento, "anticuerpo humanizado", se usa en el presente documento como un subconjunto de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una realización, un anticuerpo

humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los restos de una HVR del receptor se han sustituido por restos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad, y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los restos FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los restos no humanos correspondientes. Adicionalmente, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden efectuar para perfeccionar adicionalmente el funcionamiento de los anticuerpos, tal como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una secuencia de inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de la inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de restos FR individuales que mejoran la eficacia de los anticuerpos, tal como la afinidad de unión, isomerización, inmunogenicidad, etc. En algunas realizaciones, El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR no suele ser mayor de 6 en la cadena H y, en la cadena L, de no más de 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de Estados Unidos números 6.982.321 y 7.087.409. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados se dirigen contra un único sitio antigénico. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados se dirigen contra múltiples sitios antigénicos. Un método de humanización alternativo se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.981.843 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2006/0134098.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios del extremo amino de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Los dominios variables de la cadena pesada y la cadena ligera pueden denominarse "VH" y "VL", respectivamente. Estos dominios son generalmente las partes más variables del anticuerpo (relativas a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión a antígeno.

La expresión "región hipervariable", "HVR", o "HV", cuando se usan en el presente documento se refieren a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman los bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 expresan la mayor diversidad de los seis HVR, y se cree que H3 en particular juega un papel único en conferir especificidad fina a los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Xu *et al. Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos de camélidos de origen natural consistentes en una única cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993) y Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Están en uso numerosas delineaciones de HVR y están abarcadas en el presente documento. Las HVR que son regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de la secuencia y son las más comúnmente utilizadas (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Las HVR de Chothia se refieren en su lugar a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk. *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los restos de cada una de estas HVR se señalan a continuación.

Loon	Kabat	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L26-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H32	H30-H35B (Numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H32	H30-H35 (Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H53-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Salvo que se indique otra cosa, los restos del dominio variable (restos HVR y restos de la región marco) se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *citado anteriormente*.

Restos "marco" o "FR" son aquellos restos de dominio variable diferentes de los restos HVR como se define en el presente documento.

La expresión "numeración de resto de dominio variable como en Kabat" o "numeración de posición de aminoácidos como en Kabat", y sus variaciones, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *citado anteriormente*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos

o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento o inserción en, una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) tras el resto 52 de H2 y los restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) tras el resto 82 de la FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante alineamiento en las regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada según Kabat "convencional".

Un "marco aceptor humano" para los fines del presente documento es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VL o VH procedente de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano. Un marco aceptor humano "derivado de" un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos del mismo, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos preexistente. En algunas realizaciones, el número de cambios de aminoácidos preexistentes son 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos.

"Porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia polipeptídica de referencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y no considerar cualquier sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la materia, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles de manera pública, tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros necesarios para alinear secuencias, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr un alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Por ejemplo, el % de identidad de secuencia de un aminoácido de una secuencia aminoácidos A dada para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia para, con o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente:

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de restos de aminoácidos puntuado como correspondencias idénticas por la secuencia en este alineamiento del programa de A y B, y en el que Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.

Un anticuerpo que se "une a", "se une específicamente a" o es "específico de" un polipéptido o un epítipo particular en un polipéptido concreto es uno que se une a un polipéptido o epítipo particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico. En algunas realizaciones, la unión de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento a un polipéptido sin Siglec-8 no relacionado es menor de aproximadamente 10 % del anticuerpo que se une a Siglec-8 como se midió mediante los métodos conocidos en la materia (por ejemplo, ensayo inmunoanalítico de adsorción (ELISA)). En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 (por ejemplo, La proteína de fusión Siglec-8 Fc en forma dimérica (SEQ ID NO: 74)) tiene una constante de disociación (Kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, $\leq 100 \text{ nM}$, $\leq 10 \text{ nM}$, $\leq 2 \text{ nM}$, $\leq 1 \text{ nM}$, $\leq 0,7 \text{ nM}$, $0 (6 \text{ nM})$, $\leq 0,5 \text{ nM}$, $\leq 0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8}M o menos, por ejemplo, de 10^{-8} M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9}M a 10^{-13} M).

El término "Siglec-8" como se usa en el presente documento se refiere a una proteína Siglec-8 humana. El término incluye también variantes de origen natural de Siglec-8, incluyendo variantes de corte y empalme o variantes alélicas. Se muestra la secuencia de aminoácidos de una Siglec-8 humana ilustrativa en la SEQ ID NO: 72. Se muestra la secuencia de aminoácidos de otra Siglec-8 humana ilustrativa en la SEQ ID NO: 73. En algunas realizaciones, una proteína Siglec-8 humana comprende el dominio extracelular de la Siglec-8 humana fusionado a una región Fc de la inmunoglobulina. La secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular de la Siglec-8 humana ilustrativa fusionado con una región Fc de la inmunoglobulina se muestra en la SEQ ID NO: 74. La secuencia de aminoácidos subrayada en la SEQ ID NO: 74 indica la región Fc de la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Siglec-8 Fc.

Secuencia de aminoácidos de Siglec-8 humana

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFYYPQDGTSDPVGHWYFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLN
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGDA
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
 IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDGMEKAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
 SGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETAQLRNHNPPSSKEV
 RG (SEQ ID NO:72)

5 Secuencia de aminoácidos de Siglec-8 humana

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFYYPQDGTSDPVGHWYFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLN
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGDA
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFC
 IIFIIVRSCRKKSARPAAGVGDGMEKAKAIRGSASQGPLTESWKDGNPLKKPPPAVAPS
 SGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETAQLRNHNPPSSKEV
 RG (SEQ ID NO:73)

10 Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Siglec-8 Fc

GYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFYYPQDGTSDPVGHWYFRAGDRPYQDAPVATN
 NPDREVQAETQGRFQLLGDWISNDCSLSDARKRDKGSYFFRLERGSMSKWSYKSQLN
 YKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESQHSRNLTCVSPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG
 PTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWNLTMTVFQGDA
 TASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVH
 VRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIEGRSDKTHTCPP
CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:74)

15 Los anticuerpos que "inducen la apoptosis" o son "apoptóticos" son aquellos que inducen la muerte celular programada como se determina mediante ensayos convencionales de apoptosis, tales como la unión de la anexina V, la fragmentación del ADN, contracción celular, dilación del retículo endoplásmico, fragmentación celular, y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). Por ejemplo, la actividad apoptótica de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 de la presente invención pueden mostrarse mediante la tinción de células con la anexina V.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación por defecto de los receptores superficiales celulares (por ejemplo, receptores de los linfocitos B); y activación de los linfocitos B.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida sobre los receptores de Fc (FcR) presente en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que transporta un antígeno y destruir posteriormente la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y sin requeridos para destruir la célula diana mediante este mecanismo. Las células principales para mediar la ADCC, los linfocitos NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento potencia la ADCC. Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos números 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa o adicional, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656 (1998). Otras variantes de Fc que alteran la actividad ADCC y otras propiedades del anticuerpo incluyen aquellas divulgadas por Ghetie *et al.*, *Nat Biotech.* 15:637-40, 1997; Duncan *et al.*, *Nature* 332:563-564, 1988; Lund *et al.*, *J. Immunol* 147:2657-2662, 1991; Lund *et al.*, *Mol Immunol* 29:53-59, 1992; Alegre *et al.*, *Transplantation* 57:1537-1543, 1994; Hutchins *et al.*, *Proc Natl. Acad Sci USA* 92:11980-11984, 1995; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett.* 44:111-117, 1995; Lund *et al.*, *FASEB J* 9:115-119, 1995; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett* 54:101-104, 1996; Lund *et al.*, *J Immunol* 157:4963-4969, 1996; Armour *et al.*, *Eur J Immunol* 29:2613-2624, 1999; Idusogie *et al.*, *J Immunol* 164:4178-4184, 2000; Reddy *et al.*, *J Immunol* 164:1925-1933, 2000; Xu *et al.*, *Cell Immunol* 200:16-26, 2000; Idusogie *et al.*, *J Immunol* 166:2571-2575, 2001; Shields *et al.*, *J Biol Chem* 276:6591-6604, 2001; Jefferis *et al.*, *Immunol Lett* 82:57-65, 2002; Presta *et al.*, *Biochem Soc Trans* 30:487-490, 2002; Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005-4010, 2006; Patentes de Estados Unidos números. 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.194.551; 6.737.056; 6.821.505; 6.277.375; 7.335.742; y 7.317.091.

La expresión "región Fc" se usa en el presente documento para definir una región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina, que incluye regiones Fc de secuencia nativa y regiones Fc variantes. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG se define usualmente para extenderse desde un resto de aminoácido en la posición Cys226 o de Pro230, hasta el extremo carboxilo del mismo. Las regiones Fc de secuencia nativa adecuadas para su uso en los anticuerpos de la invención incluyen IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4 humanas. Se puede introducir una única sustitución de aminoácido (S228P de acuerdo con la numeración de Kabat; designada IgG4Pro) para eliminar la heterogeneidad observada en el anticuerpo IgG4 recombinante. Véase Angal, S. *et al.* (1993) *Mol Immunol* 30, 105-108.

Anticuerpo "no fucosilado" o "deficiente en fucosa" se refiere a una variante de anticuerpo de glicosilación que comprende una región Fc en la que una estructura de hidrato de carbono unida a la región Fc tiene una fucosa reducida o carece de fucosa. En algunas realizaciones, un anticuerpo con fucosa reducida o careciendo de fucosa tiene una función ADCC mejorada. Los anticuerpos no fucosilados o deficientes en fucosa tienen fucosa reducida en relación a la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo producido en una línea celular. Una composición de un anticuerpo no fucosilado o deficiente en fucosa contemplada en el presente documento es una composición en la que menos de aproximadamente un 50 % de glicanos unidos a N unidos a la región Fc de los anticuerpos en la composición comprende fucosa.

Los términos "fucosilación" o "fucosilado" se refieren a la presencia de restos de fucosa en los oligosacáridos unidos a la estructura peptídica de un anticuerpo. De manera específica, un anticuerpo fucosilado comprende una fucosa unida a α (1,6) en el resto de N-acetilglucosamina (GlcNAc) más interno en uno o ambos de los oligosacáridos unidos a N unidos a la región Fc del anticuerpo, por ejemplo, en la posición Asn 297 del dominio Fc de la IgG1 humana (numeración UE de los restos de la región Fc). Asn297 también se puede situar aproximadamente + 3 aminoácidos en dirección 5' o 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de menor importancia en la secuencia de las inmunoglobulinas.

El "grado de fucosilación" es el porcentaje de oligosacáridos fucosilados en relación a todos los oligosacáridos identificados mediante los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, en una composición de anticuerpo tratada con N-glicosidasa F evaluada mediante espectrometría de masas con tiempo de vuelo de desorción ionización mediante matriz asistida por láser (MALDI TOF MS). En una composición de un "anticuerpo completamente fucosilado", prácticamente todos los oligosacáridos comprenden restos de fucosa, es decir, están fucosilados. En algunas realizaciones, una composición de un anticuerpo completamente fucosilado tiene un grado de fucosilación de

al menos aproximadamente 90 %. Por consiguiente, un anticuerpo individual en dicha composición comprende normalmente restos de fucosa en cada uno de los dos oligosacáridos unidos a N en la región Fc. Por el contrario, en una composición de un anticuerpo "completamente no fucosilado" prácticamente ninguno de los oligosacáridos están fucosilados, y un anticuerpo individual en dicha composición no contiene restos de fucosa en cualquiera de los dos oligosacáridos unidos a N en la región Fc. En algunas realizaciones, una composición de un anticuerpo completamente no fucosilado tiene un grado de fucosilación de menos de aproximadamente 10 %. En una composición de un "anticuerpo parcialmente fucosilado" solo parte de los oligosacáridos comprenden fucosa. Un anticuerpo individual en dicha composición puede comprender restos de fucosa en ninguno, uno o ambos de los oligosacáridos unidos a N en la región Fc, con la condición de que la composición no comprenda esencialmente todos los anticuerpos individuales que carecen de restos de fucosa en los oligosacáridos unidos a N en la región Fc, ni esencialmente todos los anticuerpos individuales que contienen restos de fucosa en ambos oligosacáridos unidos a N en la región Fc. En una realización, una composición de un anticuerpo parcialmente fucosilado tiene un grado de fucosilación de aproximadamente 10 % a aproximadamente 80 % (por ejemplo, aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 80 % o de aproximadamente 70 % a aproximadamente 80 %).

"Afinidad de unión" como se usa en el presente documento se refiere a la fuerza de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula asociada (por ejemplo, un antígeno). En algunas realizaciones, la afinidad de un anticuerpo por una Siglec-8 (que puede ser un dímero, tal como la proteína de fusión Siglec-8-Fc descrita en el presente documento) puede generalmente representarse por una constante de disociación (K_d). La afinidad puede medirse mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluyendo aquellos descritos en el presente documento.

"Aidez de unión" como se usa en el presente documento se refiere a la fuerza de unión de múltiples sitios de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su molécula asociada (por ejemplo, un antígeno).

Una molécula de ácido nucleico "aislada que codifica los anticuerpos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada ordinariamente en el entorno en el que se produjo. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento está en una forma diferente de en la forma o ajuste en la que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácidos nucleicos aisladas se distinguen por tanto del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos que existen en el presente documento naturalmente en las células.

La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en dicha forma de tal manera que permite que sea eficaz la actividad biológica del principio activo, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al cual se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

"Vehículos" como se usa en el presente documento incluyen vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a los anteriores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG), y PLURONICS™.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o la célula que se está tratando durante el ciclo de patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión o pronóstico mejorado. Un individuo se "trata" satisfactoriamente, por ejemplo, si uno o más síntomas asociados con un trastorno (por ejemplo, una enfermedad mediada por eosinófilos) están mitigados o eliminados. Por ejemplo, un individuo se "trata" satisfactoriamente si el tratamiento da como resultado un aumento de la calidad de vida de aquellos que padecen una enfermedad, disminuyendo la dosis de otras medicaciones requeridas para el tratamiento de la enfermedad, reduciendo la frecuencia de reincidencia de la enfermedad, disminuyendo la gravedad de la enfermedad, retrasando el desarrollo o la progresión de la enfermedad, y/o prolongando la supervivencia de los individuos.

Tal como se utiliza en el presente documento, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Por tanto, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de otra modalidad de tratamiento al individuo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevención" incluye proporcionar profilaxis con respecto a la

incidencia o reincidencia de una enfermedad en un individuo. Un individuo puede estar predispuestos a, ser susceptible a un trastorno, o estar en riesgo de desarrollar un trastorno, pero no se le ha diagnosticado todavía el trastorno. En algunas realizaciones, los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 descritos en el presente documento se usan para retrasar el desarrollo de un trastorno.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, un individuo "en riesgo" de desarrollar un trastorno puede tener o no tener una enfermedad o síntomas detectables de la enfermedad, y puede haber desplegado o no una enfermedad o síntomas detectables de la enfermedad antes de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento. "En riesgo" denota que un individuo tiene uno o más factores de riesgo, que son parámetros mensurables que están correlacionados con el desarrollo del trastorno mediado por eosinófilos y/o mediado por mastocitos, como se conoce en la materia. Un individuo que tiene uno o más de estos factores de riesgo tiene una mayor probabilidad de desarrollar el trastorno que un individuo sin uno o más de estos factores de riesgo.

15 Una "cantidad eficaz" se refiere a al menos una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el efecto deseado o indicado, incluyendo un resultado terapéutico o profiláctico. Se puede proporcionar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora mensurable de un trastorno concreto. Una cantidad terapéuticamente eficaz en el presente documento puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del paciente, y la capacidad del anticuerpo de estimular una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede ser también una en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del agente terapéutico se compensan con los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Normalmente, pero no de forma necesaria, puesto que una dosis profiláctica se usa en sujetos antes o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz puede ser menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

25 La administración "crónica" se refiere a la administración de del(de los) medicamento(s) en un modo continua, a diferencia de un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico (actividad) inicial durante un periodo de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se efectúa consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, Un "individuo" o un "sujeto" es un mamífero. Un "mamífero" para los fines del tratamiento incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoo, animales de competición, o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado vacuno, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. En algunas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

II. Anticuerpos y composiciones dirigidas contra Siglec-8

40 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a una Siglec-8 humana. En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento tiene una o más de las siguientes características: (1) se une a Siglec-8 humana; (2) se une a un dominio extracelular de una Siglec-8 humana; (3) se une a una Siglec-8 humana con una mayor afinidad que el anticuerpo 2e2 de ratón y/o el anticuerpo 2C4 de ratón; (4) se une a una Siglec-8 humana con una mayor avidez que el anticuerpo 2E2 de ratón y/o el anticuerpo 2C4 de ratón; (5) tiene una T_m de aproximadamente 70 °C-72 °C o más en un ensayo de desplazamiento térmico; (6) con un grado reducido de fucosilación o no está fucosilado; (7) se une a una Siglec-8 expresada en eosinófilos e induce la apoptosis de los eosinófilos; (8) se une a una Siglec-8 humana expresada en mastocitos y agota los mastocitos; (9) se une a una Siglec-8 expresada en mastocitos e inhibe las actividades dependientes de FcεRI de los mastocitos (por ejemplo, la liberación de la histamina, la liberación de PGD2, el flujo de Ca^{2+} , y/o la liberación de la β-hexosaminidasa, etc.); (10) se ha diseñado mediante ingeniería genética para mejorar la actividad de ADCC; (11) se une a Siglec-8 humana expresada en mastocitos y destruye los mastocitos mediante la actividad ADCC (*in vitro*, y/o *in vivo*); (12) se une a la Siglec-8 de un ser humano y un primate no humano; (13) se une al Dominio 1, el Dominio 2, y/o el Dominio 3 de la Siglec-8 humana, o se une a un polipéptido Siglec-8 que comprende el Dominio 1, el Dominio 2, y/o el Dominio 3 de la Siglec-8 humana (por ejemplo, las proteínas de fusión descritas en el presente documento); y (14) agota los eosinófilos activados con una CE50 menor que la CE50 de los anticuerpos 2E2 o 2C4 de ratón.

55 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a una Siglec-8 humana. En algunos casos, la Siglec-8 humana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. En algunos casos, la Siglec-8 humana comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 1 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 2 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 3 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 116 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácidos de SEQ ID NO: 115. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende

el aminoácido de SEQ ID NO: 117 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácidos de SEQ ID NO: 115. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 117 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácidos de SEQ ID NO: 116. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo lineal en el dominio extracelular de la Siglec-8 humana. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo conformacional en el dominio extracelular de la Siglec-8 humana. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana expresada en eosinófilos e induce la apoptosis de los eosinófilos. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana expresada en mastocitos y agota los mastocitos. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana expresada en mastocitos e inhibe la actividad mediada por mastocitos. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana expresada en mastocitos y destruye los mastocitos mediante la actividad ADCC. En algunos casos, un anticuerpo descrito en el presente documento agota los mastocitos e inhibe la activación de los mastocitos. En algunos casos, un anticuerpo en el presente documento agota los eosinófilos activados e inhibe la activación de los mastocitos.

Se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que se une a la Siglec-8 humana y a la Siglec-8 de primate no humano. La identificación de los anticuerpos con la reactividad cruzada de los primates sería útil para el ensayo preclínico de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 en primates no humanos. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a una Siglec-8 de primate no humano. En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos que se unen a una Siglec-8 humana y una Siglec-8 de primate no humano. En algunos casos, la Siglec-8 de primate no humano comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118 o una porción de la misma. En algunos casos, la Siglec-8 de primate no humano comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 119 o una porción de la misma. En algunos casos, el primate no humano es un babuino (por ejemplo, *Papio Anubis*). En algunos casos, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano, se une a un epítipo en el Dominio 1 de la Siglec-8 humana. En un caso adicional, el Dominio 1 de la Siglec-8 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En algunos casos, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano, se une a un epítipo en el Dominio 3 de la Siglec-8 humana. En un caso adicional, el dominio 3 de la Siglec-8 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114. En algunos casos, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humano. En algunos casos, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano es un anticuerpo de murino. En algunos casos, el anticuerpo que se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano es un anticuerpo IgG1 humano.

En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento es un anticuerpo monoclonal. En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento es un fragmento de anticuerpo (que incluye un fragmento de unión a antígeno), por ejemplo, un fragmento Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, o (Fab')₂. En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. En un aspecto, cualquiera de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 descritos en el presente documento están purificados.

En un aspecto, Se proporcionan anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 que compiten por la unión de Siglec-8 con el anticuerpo 2E2 de murino y el anticuerpo 2C4 de murino. Se proporcionan también anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 que se unen al mismo epítipo que el anticuerpo 2e2 de murino y el anticuerpo 2C4 de murino. En un aspecto, se proporcionan anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 que compiten con cualquiera de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 descritos en el presente documento (por ejemplo, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11) por la unión a Siglec-8. Se proporcionan también anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 que se unen al mismo epítipo que cualquier anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, HEKA, HEKF, 1C3, 1H10, 4F11).

En un aspecto de la invención, se proporcionan polinucleótidos que codifican anticuerpos dirigidos contra Siglec-8. En determinadas realizaciones, se proporcionan vectores que comprenden polinucleótidos que codifican anticuerpos dirigidos contra Siglec-8. En determinadas realizaciones, se proporcionan células hospedadoras que comprenden dichos vectores. En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 o polinucleótidos que codifican anticuerpos dirigidos contra Siglec-8. En determinadas realizaciones, una composición de la invención es una formulación farmacéutica para el tratamiento de un trastorno mediado por eosinófilos y/o un trastorno mediado por mastocitos, tal como aquellos enumerados en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de las secuencias HVR del anticuerpo 2C4 de murino. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de las secuencias HVR del anticuerpo 2E2 de murino. En algunas realizaciones, la HVR es una CDR de Kabat o una CDR de Chothia.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de las secuencias HVR del anticuerpo 1C3 de murino. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de las secuencias HVR del anticuerpo 4F11 de murino. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que

comprende 1, 2, 3, 4, 5, o 6 de las secuencias HVR del anticuerpo 1H10 de murino. En algunas realizaciones, la HVR es una CDR de Kabat o una CDR de Chothia.

En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 1 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 2 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 3 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114.

En algunos aspectos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 116 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 115. En algunos aspectos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 117 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 115. En algunos aspectos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 117 pero no a una proteína de fusión que comprende el aminoácidos de SEQ ID NO: 116.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada ente las SEQ ID NO: 67 -70; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada ente las SEQ ID NO: 67 -70; y/o en la que la región variable de la cadena ligera comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 88, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 100 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 103. En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 2 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 113.

En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 89, (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 98, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 101 y HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 104. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 3 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 114. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano.

5 En otro aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que la región variable de la cadena pesada comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 90, (ii) HVR-H2 que
10 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 96; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 99, (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID
15 NO: 102 y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105. En algunos casos, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a un epítipo en el Dominio 1 de la Siglec-8 humana, en el que el Dominio 1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112. En algunas realizaciones, el anticuerpo descrito en el presente documento se une a una Siglec-8 humana y a una Siglec-8 de primate no humano.

Un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento puede comprender cualquier secuencia de dominio variable de un marco adecuado, con la condición de que el anticuerpo retenga la capacidad de unirse a la Siglec-8 humana. Tal como se utiliza en el presente documento, las regiones marco de la cadena pesada se designan
20 "HC-FR1-FR4", y las regiones marco de la cadena ligera se designan "LC-FR1-FR4". En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende una secuencia marco del dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 26, 34, 38, y 45 (HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 y HC-FR4, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende una secuencia marco del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 48, 51,
25 55, y 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 y LC-FR4, respectivamente). En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende una secuencia marco del dominio variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 48, 51, 58, y 60 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 y LC-FR4, respectivamente).

En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena pesada que
30 comprende una secuencia marco y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco comprende las secuencias HC-FR1-HC-FR4 de las SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3), y SEQ ID NO: 45 o 46 (HC-FR4), respectivamente; HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y HVR-H3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63. En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable
35 de la cadena pesada que comprende una secuencia marco y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco comprende las secuencias HC-FR1-HC-FR4 de las SEQ ID NO: 26-29 (HC-FR1), SEQ ID NO: 31-36 (HC-FR2), SEQ ID NO: 38-43 (HC-FR3), y SEQ ID NO: 45 o 46 (HC-FR4), respectivamente; HVR-H1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61; HVR-H2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y HVR-H3
40 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 67-70. En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia marco y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco comprende las secuencias LC-FR1-LC-FR4 de las SEQ ID NO: 48 o 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3), y SEQ ID NO: 60 (LC-FR4),
45 respectivamente; HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66. En un aspecto, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia marco y regiones hipervariables, en el que la secuencia marco comprende las secuencias
50 LC-FR1-LC-FR4 de las SEQ ID NO: 48 o 49 (LC-FR1), SEQ ID NO: 51-53 (LC-FR2), SEQ ID NO: 55-58 (LC-FR3), y SEQ ID NO: 60 (LC-FR4), respectivamente; HVR-L1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64; HVR-L2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65; y HVR-L3 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 71. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2-10 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16-22. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2-10 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 23 o 24. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 11-14 y el dominio variable de la cadena ligera
55 comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16-22. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 11-14 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 23 o 24. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16. En un aspecto de estos anticuerpos, el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

65 En algunos aspectos, las secuencias HVR de la cadena pesada comprenden lo siguiente:

- a) HVR-H1 (IYGAH (SEQ ID NO: 61));
 b) HVR-H2 (VIWAGGSTNYNSALMS (SEQ ID NO: 62)); y
 c) HVR-H3 (DGSSPPYYYSMEY (SEQ ID NO: 63); DGSSPPYYYGMEY (SEQ ID NO: 67); DGSSPPYYYSMDY (SEQ ID NO: 68); DGSSPPYYYSMEV (SEQ ID NO: 69); o GSSPPYYYGMDV (SEQ ID NO: 70)).

5

En algunos aspectos, las secuencias HVR de la cadena pesada comprenden lo siguiente:

- a) HVR-H1 (SYAMS (SEQ ID NO: 88); DYYMY (SEQ ID NO: 89); o SSWMN (SEQ ID NO: 90));
 b) HVR-H2 (IISGGSYTYYSDSVKG (SEQ ID NO: 91); RIAPEDGDTEYAPKFGQ (SEQ ID NO: 92); o QIYPGDDYTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 93)); y
 c) HVR-H3 (HETAQAAWFAY (SEQ ID NO: 94); EGNYYGSSILDY (SEQ ID NO: 95); o LGPYGPFAD (SEQ ID NO: 96)).

10

En algunos aspectos, las secuencias FR de la cadena pesada comprenden los siguiente:

- a) HC-FR1 (EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLT (SEQ ID NO: 26); EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLT (SEQ ID NO: 27); QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIS (SEQ ID NO: 28); o QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLT (SEQ ID NO: 29));
 b) HC-FR2 (WVRQAPGKGLEWVS (SEQ ID NO: 31); WVRQAPGKGLEWLG (SEQ ID NO: 32); WVRQAPGKGLEWLS (SEQ ID NO: 33); WVRQAPGKGLEWVG (SEQ ID NO: 34); WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 35); o WVRQPPGKGLEWLG (SEQ ID NO: 36));
 c) HC-FR3 (RFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 38); RLSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 39); RLTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 40); RFSISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 41); RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 42); o RLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43)); y
 d) HC-FR4 (WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 45); o WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 46)).

15

20

25

En algunos aspectos, las secuencias HVR de la cadena ligera comprenden lo siguiente:

- a) HVR-L1 (SATSSVSYMH (SEQ ID NO: 64));
 b) HVR-L2 (STSNLAS (SEQ ID NO: 65)); y
 c) HVR-L3 (QQRSSYPFT (SEQ ID NO: 66); o QQRSSYPYT (SEQ ID NO: 71)).

30

35

En algunas realizaciones, las secuencias HVR de la cadena ligera comprenden lo siguiente:

- a) HVR-L1 (SASSSVSYMH (SEQ ID NO: 97); RASQDITNYLN (SEQ ID NO: 98); o SASSSVSYMY (SEQ ID NO: 99));
 b) HVR-L2 (DTSKLAY (SEQ ID NO: 100); FTSRLHS (SEQ ID NO: 101); o DTSSLAS (SEQ ID NO: 102)); y
 c) HVR-L3 (QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 103); QQGNTLPWT (SEQ ID NO: 104); o QQWNSDPYT (SEQ ID NO: 105)).

40

En algunos aspectos, las secuencias FR de la cadena ligera comprenden lo siguiente:

- a) LC-FR1 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 48); o EIILTQSPATLSLSPGERATLSC (SEQ ID NO: 49));
 b) LC-FR2 (WFQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 51); WFQQKPGQAPRLWIY (SEQ ID NO: 52); o WYQQKPGQAPRLLIY (SEQ ID NO: 53));
 c) LC-FR3 (GIPARFSGSGSDFTLTISLLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 55); GVPARFSGSGSDTYTLTISLLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 56); GVPARFSGSGSDFTLTISLLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 57); o GIPARFSGSGSDTYTLTISLLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 58)); y
 d) LC-FR4 (FGPGTKLDIK (SEQ ID NO: 60)).

45

50

En algunos aspectos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 (por ejemplo, un anticuerpo humanizado dirigido contra Siglec-8) que se une específicamente a la Siglec-8 humana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que el anticuerpo comprende:

55

- (a) un dominio variable de la cadena pesada que comprende:

60

- (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 26 -29;
- (2) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;
- (3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 31 -36;
- (4) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
- (5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 38 -43;
- (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y

65

(7) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 45 -46, y/o

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende:

- 5 (1) una LC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 48 -49;
 (2) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;
 (3) una LC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 51 -53;
 (4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
 10 (5) una LC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 55 -58;
 (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y
 (7) una LC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre las SEQ ID NO: 2-10 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre las SEQ ID NO: 16-22. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre las SEQ ID NO: 2-10 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre las SEQ ID NO: 23 o 24. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre las SEQ ID NO: 11-14 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre las SEQ ID NO: 16-22. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre las SEQ ID NO: 11-14 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre la SEQ ID NO: 23 o 24. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado de la SEQ ID NO: 6 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre las SEQ ID NO: 16 o 21.

En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre las SEQ ID NO: 106-108 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre las SEQ ID NO: 109-111. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 106 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de la SEQ ID NO: 109. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 107 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de la SEQ ID NO: 110. En un aspecto, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 108 y/o que comprende un dominio variable de la cadena ligera seleccionado de la SEQ ID NO: 111.

En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 2-14. En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 106-108. En algunos casos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia contiene sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esta secuencia de aminoácidos retiene la capacidad de unirse a la Siglec-8 humana. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos) se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 106 -108.

En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16-24. En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 109-111. En algunos casos, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de la secuencia contiene sustituciones, inserciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia, pero un anticuerpo que comprende esta secuencia de aminoácidos retiene la capacidad de unirse a la Siglec-8 humana. En algunas realizaciones, las sustituciones, inserciones o deleciones (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, o 5 aminoácidos) se producen en regiones fuera de las HVR (es decir, en las FR). En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 16 o 21. En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 109 -111.

5 En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada como se representa gráficamente en la FIG. 1 o la FIG. 3.

En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena ligera como se representa gráficamente en la FIG. 2 o la FIG. 3.

10 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende (a) una, dos, o tres VH HVR seleccionadas entre aquellas que se muestran en la FIG. 1 o la FIG. 3 y/o (b) una, dos o tres VL HVR seleccionadas entre aquellas que se muestran en la FIG. 2 o la FIG. 3. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada seleccionado entre aquellos que se muestran en la FIG. 1 o la FIG. 3 y un dominio variable de la cadena ligera seleccionado entre aquellos que se muestra en la FIG. 2 o la FIG. 3.

20 En algunos casos, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende un dominio variable de la cadena pesada y/o un dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo que se muestra en la Tabla 3, por ejemplo, anticuerpo HAKA, anticuerpo HAKB, anticuerpo HAKC, etc.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases, por ejemplo, las humanas expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2. Los anticuerpos IgG1 pueden existir en múltiples variantes polimórficas denominadas alotipos (revisados en Jefferis y Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Tema 4 1-7) cualquiera de los cuales son adecuados para su uso en algunas de las realizaciones de la invención. Las variantes alotípicas comunes en poblaciones humanas son aquellas designadas por las letras a,f,n,z o las combinaciones de las mismas. En cualquiera de las realizaciones en el presente documento, el anticuerpo puede comprender una región Fc de cadena pesada que comprende una región Fc de la IgG humana. En realizaciones adicionales, la región Fc de la IgG humana comprende una IgG1 o IgG4 humana. En algunas realizaciones, la IgG4 humana comprende la sustitución de aminoácidos S228P, en el que los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice UE como en Kabat. En algunos casos, la IgG1 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78. En algunos casos, la IgG4 humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79.

35 En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 75; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 87; y/o una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 agota los mastocitos e inhibe la activación de los mastocitos. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 agota los eosinófilos activados e inhibe la activación de los mastocitos.

1. Afinidad del anticuerpo

45 En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a Siglec-8 humana con aproximadamente la misma o mayor afinidad y/o mayor avidéz en comparación con el anticuerpo 2E2 de ratón y/o el anticuerpo 2C4 de ratón. En determinadas realizaciones, se proporciona en el presente documento un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 que tiene una constante de disociación (kd) de $\leq 1 \mu\text{M}$, 150 nM , 100 nM , $\leq 50 \text{ nM}$, 10 nM , $\leq 1 \text{ nM}$, $0,1 \text{ nM}$, $\leq 0,01 \text{ nM}$ o $\leq 0,001 \text{ nM}$ (por ejemplo, 10^{-8}M o menos, por ejemplo, de 10^{-8}M a 10^{-13} M , por ejemplo, de 10^{-9} M a 10^{-13} M). En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a la Siglec-8 humana en aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 7 veces, aproximadamente 8 veces, aproximadamente 9 veces o aproximadamente 10 veces con mayor afinidad que el anticuerpo 2E2 de ratón y/o el anticuerpo 2C4 de ratón. En algunas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16 o 21.

60 En una realización, Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, se puede medir la Kd o el valor de la Kd utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) a 25 °C con obleas CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, las obleas del biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del suministrador. Los anticuerpos de captura (por ejemplo, anticuerpo dirigido contra Fc humano) se diluyen con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, antes de la inyección a un caudal de 30 $\mu\text{l}/\text{minuto}$ y se inmovilizan además con un anticuerpo dirigido contra Siglec-8. Para las mediciones

cinéticas, diluciones en serie de dos veces de Siglec-8 dimérica se inyectaron en PBS con Tween 20 al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las velocidades de asociación (kon) y las velocidades de disociación (koff) se calcularon usando un modelo sencillo de unión uno-a-uno de Langmuir (BIAcore® Software de evaluación versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (Kd) se calcula como el cociente koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881.

En otra realización, se puede usar la interferometría de biocapas para determinar la afinidad de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 frente a Siglec-8. En un ensayo ilustrativo, La proteína Siglec-8 etiquetada con Fc se inmoviliza sobre sensores de captura dirigidos contra anticuerpos humanos, y se incuba con concentraciones crecientes de fragmentos Fab de ratón, quiméricos, o humanizados dirigidos contra Siglec-8 para obtener las mediciones de la afinidad usando un instrumento tal como, por ejemplo, el Sistema Octet Red 384 (ForteBio).

La afinidad de unión del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 puede, por ejemplo, determinarse también mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980) usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia relevante. Véase también Scatchard, G., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51:660(1947).

2. Aidez del anticuerpo

En una realización, Se puede determinar la avidez de unión del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, la Kd o el valor de la Kd puede medirse utilizando un BIAcore T100. Los anticuerpos de captura (por ejemplo, un anticuerpo de cabra dirigido contra Fc humano y un anticuerpo de cabra dirigido contra Fc de ratón) se inmovilizan sobre una oblea CM5. Las celdas de flujo se pueden inmovilizar con anticuerpo dirigidos contra Ig humana o con anticuerpos dirigidos contra Ig de ratón. El ensayo se lleva a cabo a una determinada temperatura y caudal, por ejemplo, a 25 °C a un caudal de 30 µl/min. La Siglec-8 dimérica se diluyó en un tampón de ensayo a diversas concentraciones, por ejemplo, a una concentración que varía de 15 nM a 1,88 µM. Se capturaron los anticuerpos y se llevaron a cabo inyecciones de alto rendimiento, seguido por disociaciones. Se regeneraron celdas de flujo con un tampón, por ejemplo, glicina 50 mM, pH 1,5. Los resultados se refirieron al blanco con una celda de referencia vacía y múltiples inyecciones de tampón de ensayo, y se analizaron con unos parámetros de ajuste global 1:1.

3. Ensayos de competición

Se pueden usar ensayos e competición para determinar si dos anticuerpos se unen al mismo epítipo reconociendo epítopos idénticos o estéricamente solapantes o un anticuerpo inhibe competitivamente la unión de otro anticuerpo con el antígeno. Se conocen estos ensayos en la materia. Normalmente, el antígeno o las células que expresan antígenos se inmovilizan en una placa multipocillo y se mide la capacidad de los anticuerpos sin marcar para bloquear la unión de los anticuerpos marcados. Las marcas comunes para dichos ensayos de competición son marcas radioactivas o marcas enzimáticas. En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento compite con un anticuerpo 2E2 descrito en el presente documento, por la unión al epítipo presente sobre la superficie celular de una célula (por ejemplo, un eosinófilo). En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento compite con un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, por la unión al epítipo presente sobre la superficie celular de una célula (por ejemplo, un eosinófilo). En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento compite con un anticuerpo 2C4 descrito en el presente documento, por la unión al epítipo presente sobre la superficie celular de una célula (por ejemplo, un eosinófilo). En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento compite con un anticuerpo que comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (como se encuentra en la patente de Estados Unidos n.º 8.207.305), y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (como se encuentra en la patente de Estados Unidos n.º 8207.305), por la unión al epítipo presente sobre la superficie celular de una célula (por ejemplo, un eosinófilo).

4. Estabilidad térmica

En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento tiene una temperatura de fusión (Tm) de al menos aproximadamente 70 °C, al menos aproximadamente 71 °C, o al menos aproximadamente 72 °C en un ensayo de desplazamiento térmico. En un ensayo de desplazamiento térmico ilustrativo, las muestras que comprenden un anticuerpo humanizado dirigido contra Siglec-8 se incubaron con un colorante fluorescente (Sypro Orange) durante 71 ciclos con un aumento de 1°C por ciclo en un ciclador térmico de qPCR para determinar la Tm. En algunas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 tiene una Tm similar o mayor en comparación con el anticuerpo 2E2 de ratón y/o el anticuerpo 2C4 de ratón. En algunas realizaciones en el presente documento, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; y/o una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NO: 16 o 21. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 tiene una Tm igual o mayor en comparación con un anticuerpo 2C4 quimérico. En algunas

realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 tiene la T_m igual o mayor en comparación con un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 84 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85.

5. *Ensayos de actividad biológica*

En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento induce la apoptosis de los eosinófilos. En algunos otros aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento agota los mastocitos. Son bien conocidos en la técnica los ensayos para evaluar la apoptosis de las células, por ejemplo, la tinción con Anexina V y el ensayo TUNNEL. En un ensayo de apoptosis celular ilustrativos, la capa leucocitaria reciente de una muestra de sangre se resuspendió en medio y se sembró en placas en una placa de fondo en U de 96 pocillos. Una serie de diluciones en serie de 5 veces de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 se añadió a cada pocillo y se incubó la placa a 37 °C en CO₂ al 5 % durante más de cuatro horas. Las células se fijaron con para formaldehído diluido en PBS y se tiñeron con anticuerpos conjugados específicos de eosinófilos para la detección utilizando un microscopio. Se evaluó la población de eosinófilos en los leucocitos de la sangre periférica total cuando la capa leucocitaria se incubó en presencia del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 en comparación con cuando la capa leucocitaria no se incubó en presencia del anticuerpo dirigido contra Siglec-8. En otro ensayo ilustrativo, los eosinófilos purificados a partir de una muestra de sangre (por ejemplo, Kit de aislamiento de eosinófilos Miltenyi) se resuspendieron en medio y se cultivaron en presencia o ausencia de IL-5 durante la noche. Los eosinófilos cultivados se recogieron posteriormente mediante centrifugación, se resuspendieron en medio, y se sembraron en placas en una placa de fondo en U de 96 pocillos. Una serie de diluciones en serie de 5 veces de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 se añadió a cada pocillo y se incubó la placa a 37 °C en CO₂ al 5 % durante más de cuatro horas. Las células se fijaron y se tiñeron con Anexina-V usando técnicas convencionales bien conocidas en la materia, se detectó el número de eosinófilos usando un microscopio. Se evaluó la población de eosinófilos en la muestra cuando las células purificadas se incubaron en presencia del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 en comparación con cuando las células purificadas no se incubaron en presencia del anticuerpo dirigido contra Siglec-8.

En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento induce la actividad ADCC. En algunos otros aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 mediante la actividad ADCC. En algunas realizaciones, una composición comprende anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 no fucosilados (es decir, afucosilados). En algunas realizaciones, una composición que comprende anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 no fucosilados descritos en el presente documento potencia la actividad ADCC en comparación con una composición que comprende anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 parcialmente fucosilados. Los ensayos para evaluar la actividad ADCC son bien conocidos en la técnica y se describen en el presente documento. En un ensayo ilustrativo, para medir la actividad ADCC, se usaron células efectoras y células diana. Los ejemplos de células efectoras incluyen linfocitos citotóxicos naturales (NK), linfocitos granulares grandes (LGL), linfocitos citotóxicos activados por linfoquinas (LAK) y PBMC que comprenden NK y LGL, o leucocitos que tienen receptores Fc sobre las superficies de las células, tales como neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. La célula diana es cualquier célula que se expresa en los antígenos de la superficie celular que los anticuerpos que se van a evaluar pueden reconocer. Un ejemplo de dicha célula diana es un eosinófilo que expresa Siglec-8 sobre la superficie de la célula. Otro ejemplo de dicha célula diana es un mastocito que expresa Siglec-8 sobre la superficie de la célula. Las células diana se marcan con un reactivo que permite la detección de la citolisis. Los Ejemplos para el marcado incluyen una sustancia radioactiva tal como cromato de sodio (Na₂⁵¹CrO₄). Véase, por ejemplo, Immunology, 14, 181 (1968); J. Immunol. Methods, 172, 227 (1994); y J. Immunol. Methods, 184, 29 (1995).

En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento inhibe las actividades mediadas por mastocitos. La triptasa de los mastocitos se ha usado como un biomarcador para el número y la activación total de mastocitos. Por ejemplo, la triptasa total y activa así como la histamina, la N-metil histamina, y la 11-beta-prostaglandina F₂ pueden medirse en sangre u orina para evaluar la reducción de los mastocitos. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º US 20110293631 para un ensayo de actividad de los mastocitos ilustrativo. Los ensayos descritos en el Ejemplo 2 en el presente documento se pueden usar también para evaluar ADCC y la actividad apoptotótica de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 sobre los mastocitos.

6. *Ensayos de unión a proteínas de fusión*

Los ensayos de unión con proteínas de fusión se pueden usar para determinar al epítipo reconocido por un anticuerpo. Se conocen en la técnica ensayos que utilizan proteínas de fusión para el cartografiado. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una porción de una proteína Siglec-8 fusionada a una Ig-Fc humana se inmoviliza sobre una placa multipocillos y se mide la capacidad de los anticuerpos de unirse a la proteína de fusión. En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115. En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116. En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117. En algunos aspectos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se une a una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 118.

III. Preparaciones de anticuerpos

5 El anticuerpo descrito en el presente documento se prepara usando las técnicas disponibles en la materia para generar anticuerpos, cuyos métodos ilustrativos se describen con más detalle en las siguientes secciones.

1. Fragmentos de anticuerpos

10 La presente invención abarca fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden generar por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o mediante técnicas recombinantes. En determinados casos hay ventajas en cuanto al uso de fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. Para una revisión de determinados fragmentos de anticuerpos, véase Hudson et al. (2003) Nat. Med. 9:129-134.

15 Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente mediante células hospedadoras recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo de este modo una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos pueden aislarse a partir de las fagotecas de anticuerpos discutidas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* aumentada que comprenden restos de epítomos de unión a receptores salvajes se describen en la patente de Estados Unidos 5.869.046. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para el experto en la materia. En determinadas realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; Patentes de Estados Unidos números. 5.571.894; y 5.587.458. Fv y sFv son los únicos tipos con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, pueden ser adecuados para una unión no específica reducida durante su uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora tanto en el extremo amino como en el extremo carboxi de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, citado anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

35 2. Anticuerpos humanizados

La invención abarca anticuerpos humanizados. En la materia se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, Un anticuerpo humanizado puede tener uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter (Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536), sustituyendo secuencias de la región hipervariable por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de FR están sustituidos por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

50 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor (por ejemplo, ratón) se selecciona frente a la biblioteca completa de las secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más cercana a la del roedor se acepta entonces como la región marco humana del anticuerpo humanizado (Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901. Otro método usa una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de las cadenas ligera o pesada. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; Presta et al. (1993) *J. Immunol.*, 151:2623).

60 Es deseable generalmente además que los anticuerpos sean humanizados con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, de acuerdo con un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y exponen posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias seleccionadas de la inmunoglobulina candidata. La inspección de estas presentaciones permite el análisis

del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que alteran la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, de tal manera que se consigue una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente, y más sustancialmente, implicados en la influencia de la unión a antígeno.

3. Anticuerpos humanos

Los anticuerpos humanos dirigidos contra Siglec-8 de la invención pueden construirse combinando secuencia(s) de dominios variables de clones Fv humanos seleccionados entre bibliotecas de expresión en fagos con secuencia(s) de dominios constantes humanos constantes conocidas. Como alternativa, Los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 monoclonales humanos de la invención pueden prepararse mediante el método del hibridoma. Se han descrito las líneas celulares del mieloma humano y del heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, en Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991).

Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (JH) en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado una completa inhibición de la producción endógena de anticuerpos. la transferencia de una matriz génica de la inmunoglobulina de una línea germinal humana en dichos ratones mutantes de una línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras el estímulo del antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993).

Se puede usar también el intercambio de genes para derivar anticuerpos humanos a partir de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedores), cuando el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades diferentes con el anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este método, que también se denomina "impresión de epítomos", la región variable de la cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de expresión en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creando un población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana o no humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido al eliminar la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión en fagos primario, es decir, el epítipo gobierna la elección de la cadena humana asociada. Cuando se repite el proceso para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abr. de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen restos de FR o CDR de origen no humano.

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión por al menos dos epítomos diferentes. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos humanos o humanizados. En determinadas realizaciones, una de las especificidades de unión es por Siglec-8 y la otra es por cualquier otro antígeno. En determinadas realizaciones, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de Siglec-8. Se pueden utilizar también anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan Siglec-8. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂ biespecíficos).

Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. véase Milstein y Cuello, Nature, 305: 537 (1983), documento WO 93/08829 publicado el 13 de mayo de 1993, y Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655 (1991). Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986). Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los anticuerpos reticulantes adecuados son bien conocidos en la técnica, y se divulgan en la patente de Estados Unidos n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

5. Anticuerpos de dominio único

En algunos casos, un anticuerpo de la invención es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de un único dominio es una única cadena polipeptídica que comprenden toda o una parte del dominio variable de la cadena pesada o toda o una parte del dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo. En determinados casos, un anticuerpo de un único dominio es un anticuerpo de un único dominio humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véanse, por ejemplo,

patente de Estados Unidos n.º 6.248.516 B1). En una realización, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una parte del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

6. Variantes de anticuerpos

5 En algunos aspectos, se contemplan la modificación o modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo pueden prepararse introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones, y/o inserciones y/o sustituciones de, restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de deleción, inserción, y sustitución se puede realizar para conseguir la construcción final, con la condición de que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se realiza la secuencia.

15 Un método útil para la identificación de determinados restos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina" como se describe en Cunningham y Wells (1989) Science, 244:1081-1085. En este caso, se identifican un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) que influye sobre la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación introduciendo variantes adicionales o diferentes en, o para, los sitios de sustitución. Así, aunque el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos esté predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se llevó a cabo el barrido de Ala o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y se cribaron las variantes de anticuerpos expresadas para la actividad deseada.

30 Las inserciones en secuencias de aminoácidos incluyen fusiones en el extremo amino y/o carboxilo en el intervalo de longitud de un resto a polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Los ejemplos de inserciones en los extremos incluyen un anticuerpo con un resto metionilo en el extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o C del anticuerpo con una enzima o con un polipéptido que aumente la semivida en suero del anticuerpo.

35 En determinados casos, un anticuerpo de la invención se altera para aumentar o disminuir la medida en la que el anticuerpo está glicosilado. La glicosilación de anticuerpos es normalmente una unión al átomo de N o una unión al átomo de O. La unión al átomo de N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es un aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de una de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glicosilación. La glicosilación unida al átomo de O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxisilina.

45 La adición o deleción de sitios de glicosilación al anticuerpo se lleva a cabo convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de modo que se crean o eliminan una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración puede realizarse también mediante la adición, deleción o sustitución de uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

50 Si el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el hidrato de carbono unido a esta. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el hidrato de carbono unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y patente de estados Unidos n.º 6.602.684, Umana et al. Los anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se notifican en el documento WO 1997/30087, Patel et al. Véanse, también, Los documentos WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) que se refieren a anticuerpos con hidratos de carbono alterados unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

60 En determinados casos, una variante de glicosilación comprende una región Fc, en la que una estructura de hidrato de carbono unida a la región Fc carece de fucosa o tiene la fucosa reducida. Tales variantes tienen una función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende adicionalmente una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración Eu de restos). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: documento US 2003/0157108; documento WO 2000/61739; documento WO

2001/29246; documento US 2003/0115614; documento US 2002/0164328; documento US 2004/0093621; documento US 2004/0132140; documento US 2004/0110704; documento US 2004/0110282; documento US 2004/0109865; documento WO 2003/085119; documento WO 2003/084570; documento WO 2005/035586; documento WO 2005/035778; documento WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Los ejemplos de líneas de células productoras de anticuerpos defucosilados incluyen células Lec 13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Sol. Pat. EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares inactivadas génicamente, tal como el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO inactivadas genéticamente (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)), y células que expresan en exceso β 1,4-N-acetilglicosiltransferasa III (GnT-III) y Golgi μ -manosidasa II (ManII).

Se contemplan anticuerpos en el presente documento que tienen la fucosa reducida con respecto a la cantidad de fucosa en el mismo anticuerpo en una célula CHO natural. Por ejemplo, el anticuerpo tiene una cantidad más baja de fucosa de la que se hubiera tenido si se hubiera producido por células CHO naturales (por ejemplo, una célula CHO que produce un modelo de glicosilación natural, tal como, una célula CHO que contiene un gen FUT8 natural). En determinadas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 proporcionado en el presente documento es aquel en el que menos de aproximadamente el 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o 1 % de los glicanos unidos a N del anterior comprenden fucosa. En determinados casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 proporcionado en el presente documento es aquel en el que ninguno de los glicanos unidos a N del anterior comprenden fucosa, es decir, en el que el anticuerpo está completamente sin fucosa, o no tiene fucosa o no está fucosilado o está afucosilado. Se puede determinar la cantidad de fucosa calculando la cantidad promedio de fucosa incluida en la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glicoestructuras unidas en Asn297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) tal como se determina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, tal como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto asparagina situado aproximadamente en la posición 297 de la región Fc (numeración Eu de los restos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también se puede situar aproximadamente \pm 3 aminoácidos en dirección 5' o 3' de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones en la secuencia de los anticuerpos de menor importancia. En algunos casos, al menos una o dos de las cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada.

En un aspecto, el anticuerpo está alterado para mejorar su semivida en suero. Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "epítipo de unión del receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG (documento US 2003/0190311, la patente de Estados Unidos n.º 6.821.505; la patente de Estados Unidos n.º 6.165.745; la patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; la patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; la patente de Estados Unidos n.º 6.165.745; la patente de Estados Unidos n.º 5.834.597).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácido. Estas variantes tienen al menos un resto aminoácido en la molécula del anticuerpo sustituido por un resto diferente. Los sitios de interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero se contemplan también alteraciones de FR. En la Tabla 1 se muestran sustituciones conservativas bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir más cambios sustanciales, denominados "sustituciones ilustrativas" en la Tabla 1, o como se describe a continuación en referencia a las clases de aminoácidos y seleccionarse los productos.

Tabla 1.

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

(continuación)

Resto original	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del armazón polipeptídico en la zona de la sustitución, por ejemplo, en una conformación de lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en *Biochemistry*, segunda ed., págs. 73-75, Worth Publishers, Nueva York (1975)):

- 5
- 10 (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- 15 (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His (H)

Como alternativa, los restos de origen natural pueden dividirse en grupos basándose en las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 20 (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- 25 (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) restos que influyen la orientación de cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos pueden introducirse también en los sitios de sustitución conservativa o, en los sitios restantes (no conservados).

Un tipo de variante de sustitución implica sustituir uno o más restos en la región hipervariable de un anticuerpo precursor (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). Generalmente, la una o más variantes resultantes seleccionadas para desarrollo adicional tendrán propiedades biológicas modificadas (por ejemplo, mejoradas) con respecto al anticuerpo precursor a partir del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes de sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con al menos parte de una proteína de revestimiento de fago (por ejemplo, el producto del gen III de M13) empaquetada con cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se seleccionan a continuación para su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión). A fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede llevar a cabo una mutagénesis de barrido (por ejemplo, barrido de alanina) para identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión del antígeno. De forma alternativa o adicional, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas conocidas en la materia, incluyendo las elaboradas en el presente documento. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado usando técnicas conocidas en la materia, incluyendo las descritas en el presente documento, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para desarrollo adicional.

50 Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan

mediante diversos métodos conocidos en la materia. Estos métodos incluyen, aunque no de forma limitativa, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos que se producen naturalmente) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante la PCR, y la mutagénesis de casete de una variante preparada inicialmente o una versión no variante del anticuerpo.

Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de la invención, generando de este modo una variante de región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de la IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 Fc humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos incluyendo la de una cisteína bisagra. En algunas realizaciones, la variante de la región Fc comprende una región Fc de la IgG4 humana. En una realización más, la región Fc de la IgG4 humana comprende la sustitución de aminoácido S228P, en la que los restos de aminoácidos se numeran de acuerdo con el índice UE como en Kabat.

De acuerdo con esta descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo de la invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos conservarían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo natural. Por ejemplo, se piensa que se pueden realizar determinadas alteraciones en la región Fc que darían como resultado una unión a C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan y Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de Estados Unidos n.º 5.648.260; la patente de Estados Unidos n.º 5.624.821; y el documento WO 94/29351 que se refiere a otros ejemplos de variantes en la región Fc. Los documentos WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas aumentadas y unión mejorada al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de las IgG de la madre al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se han descrito en el documento US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Se describen variantes polipeptídicas con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q aumentada o disminuida en la patente de Estados Unidos n.º 6,194,551B1, el documento WO99/51642). Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

7. Vectores, Células hospedadoras y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que se utilizará. Generalmente, las células hospedadoras son de origen procarionta o eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que pueden usarse regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

45 Anticuerpos generadores que utilizan células hospedadoras procariontas:

a) Construcción de vectores

Se pueden obtener secuencias de polinucleótidos que codifican componentes polipeptídicos del anticuerpo de la invención usando técnicas recombinantes convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar a partir de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Como alternativa, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en hospedadores procariontas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la materia se pueden usar para el propósito de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que se insertarán en el vector y de la célula hospedadora particular que se va a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, aunque no de forma limitativa: un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, un promotor, un sitio de unión al ribosoma (RBS), una secuencia de señalización, la inserción del ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de replicación y de control que se derivan de especies con la célula hospedadora se usan junto con estos hospedadores. El vector normalmente lleva un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforman normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322

5 contiene genes que codifican la resistencia a la ampicilina (Amp) y a la tetraciclina y proporciona por tanto medios fáciles para identificar las células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o modificarse para contener, promotores que pueden usarse por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Los ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen con detalle en Carter et al., patente de Estados Unidos n.º 5.648.237.

10 Además, los vectores de fagos que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo hospedador pueden usarse como vectores de transformación junto con estos hospedadores. Por ejemplo, el bacteriófago, tal como λGEM.TM.-11 se puede utilizar en la preparación de un vector recombinante que se puede usar para transformar células hospedadoras susceptibles tales como *E. coli* LE392.

15 El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más parejas de promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en la dirección 5' (5') de un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariontes normalmente se dividen en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles aumentados de la transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

20 Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos por diversas células hospedadoras potenciales. El promotor seleccionado puede unirse operativamente al ADN de un cistrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor de la fuente de ADN mediante digestión de la enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia del promotor nativo como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se usan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado en comparación con el promotor polipeptídico diana nativo.

30 Los promotores adecuados para su uso en hospedadores procariontes incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β-galactamasa y lactosa, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o fagos conocidos) también son adecuados. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo por tanto a un operario experto ligarlos a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada (Siebenlist et al. (1980) *Cell* 20: 269) usando enlazadores o adaptadores para suministrar cualesquiera sitios de restricción requeridos.

35 En un aspecto de la invención, cada cistrón dentro del vector recombinante comprende un componente de la secuencia de señalización de la secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia de señalización puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el propósito de la presente invención debe ser una que sea reconocida y procesada (es decir escindida por una peptidasa de señalización) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontes que no reconocen y procesan las secuencias de señalización nativas de los polipéptidos heterólogos, la secuencia de señalización se sustituye por una secuencia de señalización procarionte seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en la fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o líderes estables de enterotoxina II (STII), LamB, PhoE, *pelB*, *OmpA* y *MBP*. En una realización de la invención, las secuencias de señalización usadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias de señalización STII o variantes de las mismas

50 En otro aspecto, la producción de la inmunoglobulina de acuerdo con la invención puede producirse en el citoplasma de la célula hospedadora, y por tanto no requiere la presencia de secuencias de señalización de la secreción en cada cistrón. A este respecto, las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina se expresan, se pliegan y ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Determinadas cepas hospedadoras (por ejemplo, las cepas *E. coli* *trxB*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo por tanto un plegado y ensamblaje adecuado de las subunidades de proteína expresadas. Proba y Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

55 Se pueden producir también anticuerpos de la invención utilizando un sistema de expresión en el que la relación cuantitativa de los componentes polipeptídicos expresados se puede modular a fin de maximizar el rendimiento de los anticuerpos secretados y ensamblados adecuadamente de la invención. Dicha modulación se logra al menos en parte modulando simultáneamente las fuerzas de traducción de los componentes del polipéptido.

60 Una técnica para modular la fuerza de la traducción se describe en Simmons et al., patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Utiliza variantes de la región de inicio de la traducción (TIR) dentro de un cistrón. Para una TIR dada, se pueden crear una serie de variantes de secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos con un rango de intensidades de traducción, proporcionando de este modo un medio conveniente por el cual ajustar este factor para el nivel de expresión deseado de la cadena específica. Las variantes de TIR se pueden generar mediante técnicas de mutagénesis convencionales que dan como resultado cambios en los codones que pueden alterar la secuencia de aminoácidos. En determinadas realizaciones, los cambios en la secuencia de nucleótidos son silenciosos. Las

alteraciones en la TIR pueden incluir, por ejemplo, alteraciones en el número o separación de las secuencias de Shine-Dalgarno, junto con alteraciones en la secuencia de la señal. Un método para generar secuencias de señalización mutantes es la generación de un "banco de codones" al comienzo de una secuencia de codificación que no cambia la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señalización (es decir, los cambios son silenciosos). Esto se puede lograr cambiando la tercera posición de nucleótido de cada codón; además, algunos aminoácidos, como leucina, serina y arginina, tienen múltiples posiciones primera y segunda que pueden agregar complejidad al hacer el banco. Este procedimiento de mutagénesis se describe con detalle en Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158.

En una realización, se genera un conjunto de vectores con un intervalo de fuerzas de TIR para cada cistrón en la misma. Este conjunto limitado proporciona una comparación de los niveles de expresión de cada cadena, así como el rendimiento de los productos de anticuerpo deseados bajo diversas combinaciones de fuerza TIR. Se pueden determinar las fuerzas TIR cuantificando el nivel de expresión de un gen indicador, como se describe en detalle en Simmons et al. patente de Estados Unidos n.º 5.840.523. Basándose en la comparación de la fuerza de traducción, las TIR individuales deseadas se seleccionan para combinarse en las construcciones del vector de expresión de la invención.

Las células hospedadoras procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos. Los ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), Bacilli (por ejemplo, *B. subtilis*), Enterobacteria, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, o *Paracoccus*. En una realización, se usan células gramnegativas. En una realización, la célula *E. coli* se usan como hospedadores de la invención. Los ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; ATCC n.º de depósito 27.325) y sus derivados, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR (patente de Estados Unidos n.º 5.639.635). Otras cepas y derivados de las mismas, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308(ATCC 31,608) son también adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos se conocen en la materia y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, se pueden usar de forma adecuada especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* como el hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula hospedadora debe secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, y se pueden incorporar, deseablemente, inhibidores de la proteasa adicionales en el cultivo celular.

b) Producción de anticuerpos

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Transformación significa introducir ADN en el hospedador procariota para que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o por un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula hospedadora utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas convencionales adecuadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio generalmente se usa para células bacterianas que contienen barreras sustanciales de pared celular. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Otra técnica más utilizada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se hacen crecer en un medio conocido en la técnica para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas. Los ejemplos de medios adecuados incluyen caldo de luria (LB) más suplementos nutricionales necesarios. En algunos casos, los medios también contienen un agente de selección, seleccionado basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan un gen resistente a ampicilina.

Cualquier suplemento necesario además de carbono, nitrógeno y fuentes de fosfato inorgánico también puede incluirse en concentraciones adecuadas, introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento o medio tal como una fuente de nitrógeno complejo. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol y ditiotreititol.

Las células hospedadoras procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. En determinadas realizaciones, para el crecimiento de *E. coli*, las temperaturas de crecimiento varían desde aproximadamente 20 °C. a aproximadamente 39 °C.; desde aproximadamente 25 °C. a aproximadamente 37 °C.; o aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. En determinadas realizaciones, para *E. coli*, el pH es de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4,

o aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de la proteína se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células hospedadoras transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. En determinadas realizaciones, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A. P (véase, por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Se pueden usar otros diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, Como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan y se recuperan a partir del periplasma de las células hospedadoras. La recuperación de proteínas normalmente implica la alteración del microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez que las células se rompen, los restos celulares o las células completas pueden eliminarse mediante centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía en resina de afinidad. Como alternativa, las proteínas pueden transportarse a los medios de cultivo y aislarse en ellos. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para la purificación adicional de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse usando adicionalmente métodos comúnmente conocidos, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad mediante un proceso de fermentación. Están disponibles diversos procedimientos de fermentación de lotes alimentados a gran escala. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1.000 litros de capacidad y, en ciertas realizaciones, aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan impulsores agitadores para distribuir el oxígeno y los nutrientes, especialmente glucosa. La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más que aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede variar desde aproximadamente 1 litro hasta aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia normalmente después de que las células se hayan cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una DO550 de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Se pueden usar diversos inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la materia y se ha descrito anteriormente. Las células pueden crecer durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen generalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de la producción y la calidad de los polipéptidos de la invención, se pueden modificar diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento adecuados de los polipéptidos de anticuerpos secretados, vectores adicionales que expresan en exceso proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DDsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilproilil *cis*, *trans*-isomerasa con actividad de chaperona) se pueden usar para transformar simultáneamente las células procariontas hospedadoras. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en células hospedadoras bacterianas. Chen et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., patente de Estados Unidos n.º 6.083.715; Georgiou et al., patente de Estados Unidos n.º 6.027.888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden usar determinadas cepas hospedadoras de enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células hospedadoras pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes en proteasa de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), citado anteriormente; Georgiou et al., patente de Estados Unidos n.º 5.264.365; Georgiou et al., patente de Estados Unidos n.º 5.508.192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En un caso, las cepas de *E. coli* deficientes para las enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas chaperona se usan como células hospedadoras en el sistema de expresión de la invención.

c) Purificación de anticuerpos

En un caso, la proteína del anticuerpo producido en el presente documento se purifica adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para los ensayos y usos adicionales. Se pueden emplear métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la materia. Los siguientes procedimientos son ilustrativos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmovilización o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de

intercambio catiónico tal como DEAE, cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

5 En un aspecto, La proteína A inmovilizada en una fase sólida se usa para la purificación mediante inmunoafinidad de los productos del anticuerpo de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una alta afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A puede ser una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, o una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se reviste con un reactivo, tal como glicerol, para evitar posiblemente la adherencia in específica de contaminantes.

10 Como primera etapa de la purificación, se puede aplicar una preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente sobre una fase sólida inmovilizada de proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. La fase sólida se lavaría a continuación para eliminar contaminantes unidos no específicamente a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

Anticuerpos generadores que utilizan células hospedadoras eucariotas:

20 Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariota incluye generalmente uno o más de los siguientes componentes no limitantes: una secuencia de señalización, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción.

a) Componente de la secuencia de señalización

25 Un vector para su uso en una célula hospedadora eucariótica también puede contener una secuencia de señalización u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro de interés. La secuencia de señalización heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, escindida por una peptidasa de señalización) por la célula hospedadora. En la expresión en células de mamífero, están disponibles las secuencias de señalización de mamíferos así como los líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dicha región precursora se liga en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

b) Origen de replicación

35 Generalmente, no se necesita un componente de origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen del SV40 puede usarse normalmente solo porque contiene el promotor temprano.

c) Componente del gen de selección

40 Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, denominado también marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea relevante, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos.

45 Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a los fármacos y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

50 Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para las células de mamífero son los que permiten la identificación de células competentes para capturar el ácido nucleico del anticuerpo, tales como DHFR, timidina quinasa, metalotioneína I y II, genes de la metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

55 Por ejemplo, en algunos casos, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En algunas realizaciones, Una célula hospedadora adecuada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

60 Como alternativa, las células hospedadoras (particularmente los hospedadores naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o transformadas simultáneamente con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, la proteína DHFR natural, y otro marcador seleccionable tal como la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH) se puede seleccionar mediante crecimiento celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la patente de Estados Unidos n.º 4.965.199. Las células hospedadoras puede incluir NSO, CHOK1, CHOK1SV o los derivados,

65

incluyendo las líneas de células deficientes en glutamina sintetasa (GS). Los métodos para el uso de GS como un marcador seleccionable de células de mamíferos se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.122.464 y la patente de Estados Unidos n.º 5.891.693.

5 d) Componentes del promotor

Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, un anticuerpo). Son conocidas las secuencias promotoras para eucariotas. Por ejemplo, Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25-30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia de codificación. En determinadas realizaciones, cualquiera o todas estas secuencias pueden insertarse adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, con promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, el virus de la viruela aviar, adenovirus (como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 de simio (SV40), procedentes de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación del virus SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. En la patente de Estados Unidos n.º 4.419.446 se divulga un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector. En la patente de Estados Unidos n.º 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Véase también Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982), que describe la expresión del ADNc de interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa procedente del virus del herpes simple. Como alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como el promotor.

35 e) Componente del elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores aumenta a menudo insertando una secuencia potenciadora en el vector. En la actualidad se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de una célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus de ratón, el potenciador del polio en el lado posterior del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) que describe los elementos potenciadores para la activación de los promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el polipéptido del anticuerpo, pero se localiza preferentemente en el sitio 5' a partir del promotor.

f) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en las células hospedadoras eucariotas también pueden contener secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', regiones no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el anterior.

g) Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores del presente documento incluyen células de eucariotas superiores descritas en el presente documento, que incluyen células hospedadoras de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO), Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980));

células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón de canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; linfocitos FS4+; células CHOK1, células CHOK1SV o derivados y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para inducir promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

h) Cultivo de las células hospedadoras

Las células hospedadoras usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en varios medios. Medios comercialmente disponibles tales como de Ham F10 (Sigma), Medio mínimo esencial ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patente de Estados Unidos n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documento WO 90/03430; documento WO 87/00195; o patente de Estados Unidos Re. 30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes en concentraciones finales en el intervalo micromolar), y glucosa o una fuente equivalente de energía. También se pueden incluir cualesquiera otros suplementos necesarios a concentraciones adecuadas que conocerán los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia,

i) Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, los residuos en partículas, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, pueden eliminarse, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión pueden concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una técnica conveniente. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark et al., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que está unido el ligando de afinidad puede ser agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benzeno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesado más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre gel de sílice, cromatografía sobre heparina, cromatografía con SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocalización, SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Tras cualquier etapa de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a purificación adicional, por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, llevada a cabo en concentraciones bajas de sal (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, ensayo y uso clínico están bien establecidas en la materia, de acuerdo con las metodologías descritas anteriormente y/o según lo considere adecuado un experto en la materia para un anticuerpo particular de interés.

Producción de anticuerpos no fucosilados

se proporcionan en el presente documento métodos para preparar anticuerpos con un grado reducido de fucosilación. Por ejemplo, los métodos contemplados en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, el uso de líneas de células deficientes en la fucosilación de proteínas (por ejemplo, células Lee 13 CHO, células CHO inactivadas génicamente para el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, las células que expresan en exceso β 1,4-N-acetilglicosaminiltransferasa III y que expresan además Golgi μ -manosidasa II, etc.), y la adición de análogo(s) de fucosa en un medio de cultivo celular usado para la producción de anticuerpos. Véase Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); Sol. Pat. EE.UU. N.º US 2003/0157108 A1, Presta, L; documento WO 2004/056312 A1; Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); y la patente de Estados Unidos n.º 8.574.907. Las técnicas adicionales para reducir el contenido de fucosa de los anticuerpos incluyen la tecnología Glymaxx descrita en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2012/0214975. Las técnicas adicionales para reducir el contenido de fucosa de los anticuerpos incluye también la adición de uno o más inhibidores de la glicosidasa en un medio de cultivo celular usado para la producción de los anticuerpos. Los inhibidores de la glicosidasa incluyen α -glicosidasa I, α -glicosidasa II, y α -manosidasa I. En algunas realizaciones, el inhibidor de la glicosidasa es un inhibidor de la α -manosidasa I (por ejemplo, kifunensina).

Tal como se utiliza en el presente documento, "fucosilación del núcleo" se refiere a la adición de fucosa ("fucosilación") a N-acetilglucosamina ("GlcNAc") en el extremo reductor de un glicano unido a N. Se proporcionan también anticuerpos producidos por dichos métodos y las composiciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la fucosilación de un complejo de cadenas de azúcar unidas a N-glicósido unidas a la región (o dominio Fc) de un anticuerpo está reducida. Tal como se utiliza en el presente documento, un "complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido" está unido de forma típica a una asparagina 297 (de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat), aunque un complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido también puede estar unido a otros restos de asparagina. Un "complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido" excluye un tipo de cadena de azúcar con alto contenido de manosa, en el que solo la manosa se incorpora al extremo no reductor de la estructura del núcleo, sino que incluye 1) un tipo de complejo, en el que el lado del extremo no reductor de la estructura del núcleo tiene una o más ramas de galactosa-N-acetilglucosamina (también denominada como "gal-GlcNAc") y el lado del extremo no reductor de Gal-GlcNAc tiene opcionalmente un ácido siálico, que bisecta la N-acetilglucosamina o similar; o 2) un tipo híbrido, en el que el lado del extremo no reductor en la estructura del núcleo tiene ambas ramas de una cadena de azúcar unida a N-glicósido con alto contenido de manosa y un complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido.

En algunas realizaciones, el "complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido" incluye un tipo de complejo en el que el lado del extremo no reductor en la estructura del núcleo tiene cero, una o más ramas de galactosa-N-acetilglucosamina (también denominada como "gal-GlcNAc") y el lado no reductor de Gal-GlcNAc tiene opcionalmente además una estructura tal como un ácido siálico, que bisecta la N-acetilglucosamina o similar.

De acuerdo con los presentes métodos, normalmente solo una cantidad menor de fucosa se incorpora en el complejo de la(s) cadena(s) unida(s) a N-glicósido. Por ejemplo, en diversas realizaciones, menos de aproximadamente 60 %, menos de aproximadamente 50 %, menos de aproximadamente 40 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 1 % del anticuerpo tiene fucosilación del núcleo mediante fucosa en una composición. En algunas realizaciones, prácticamente nada (es decir, menos de aproximadamente 0,5 %) del anticuerpo tiene fucosilación del núcleo mediante fucosa en una composición. En algunas realizaciones, más de aproximadamente 40 %, más de aproximadamente 50 %, más de aproximadamente 60 %, más de aproximadamente 70 %, más de aproximadamente 80 %, más de aproximadamente 90 %, más de aproximadamente 91 %, más de aproximadamente 92 %, más de aproximadamente 93 %, más de aproximadamente 94 %, más de aproximadamente 95 %, más de aproximadamente 96 %, más de aproximadamente 97 %, más de aproximadamente 98 %, o más de aproximadamente 99 % del anticuerpo está sin fucosilar en una composición.

En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un anticuerpo en el que prácticamente nada (es decir, menos de aproximadamente 0,5 %) de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósido contienen un resto de fucosa. En algunas realizaciones, se proporciona en el presente documento un anticuerpo en el que al menos una o dos de las cadenas pesadas del anticuerpo no está(n) fucosilada(s).

Como se ha descrito anteriormente, se puede utilizar varios sistemas de vectores de expresión en hospedadores mamíferos para expresar un anticuerpo. En algunas realizaciones, el medio de cultivo no está suplementado con fucosa. En algunas realizaciones, se añade una cantidad eficaz de un análogo de fucosa al medio de cultivo. En este contexto, una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del análogo que es suficiente para disminuir la incorporación de la fucosa en un complejo de una cadena de azúcar unida a N-glicósido de un anticuerpo en al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos aproximadamente un 50 %. En algunas realizaciones, los anticuerpos producidos mediante los métodos instantáneos comprenden al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 40 % o al menos

aproximadamente un 50 % de proteína sin núcleo fucosilado (por ejemplo, que carece de fucosilación del núcleo), en comparación con los anticuerpos producidos a partir de las células hospedadoras cultivadas en ausencia de un análogo de fucosa.

- 5 Se puede determinar el contenido (por ejemplo, la relación) de las cadenas de azúcar en las que la fucosa no está unida a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar frente a las cadenas de azúcar en las que la fucosa está unida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos. Otros métodos incluyen hidrazinólisis o digestión enzimática (véase, por ejemplo, *Biochemical Experimentation Methods* 23: Method for Studying Glycoprotein Sugar Chain (Japan Scientific Societies Press), editado por Reiko Takahashi (1989)), el marcado fluorescente o el marcado con radioisótopos de la cadena de azúcar liberada y a continuación la separación de la cadena de azúcar marcada mediante cromatografía. Asimismo, Se pueden determinar las composiciones de las cadenas de azúcar liberadas analizando las cadenas mediante el método HPAEC-PAD (véase, por ejemplo, *J. Liq Chromatogr.* 6:1557 (1983)). (Véase generalmente la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2004/0110282.).

15

IV. Composiciones

- En algunos aspectos, también se proporcionan en el presente documento composiciones (por ejemplo, composición farmacéutica) que comprende cualquiera de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 descritos en el presente documento. En algunos aspectos, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos vinculadas con la región Fc, en el que menos de aproximadamente el 50 % de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos contienen un resto de fucosa. En algunos aspectos, se proporciona en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos vinculadas con la región Fc, en la que prácticamente ninguna de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos contienen un resto de fucosa.

- Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando el principio activo que tiene al grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Pub., Gennaro Ed., Filadelfia, Pa. 2000). Los vehículos, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones, antioxidantes incluidos ácido ascórbico, metionina, Vitamina E, metabisulfito de sodio; conservantes, isotonicantes, estabilizantes, complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); agentes quelantes, tales como EDTA y/o tensioactivos no iónicos.

- Los tampones se pueden utilizar para controlar el pH en un intervalo que optimice la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Los tampones pueden estar presente en concentraciones comprendidas de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen ácidos tanto orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. De manera adicional, los tampones pueden comprender histidina y sales de trimetilamina tales como Tris.

- Se pueden añadir conservantes para evitar el crecimiento microbiano, y suelen estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,2 %-1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso en la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol.

- Los agentes de tonicidad, a veces conocidos como "estabilizantes" pueden estar presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se utilizan con biomoléculas grandes y cargadas tales como proteínas y anticuerpos, frecuentemente se denominan "estabilizantes" porque pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de los aminoácidos, disminuyendo de esta forma el potencial de interacciones intermoleculares e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad comprendida entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 25 % en peso o entre aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % en peso, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los otros ingredientes. En algunas realizaciones, los agentes de tonicidad incluyen alcoholes azucarados polihidroxilados, alcoholes azucarados trihidratados o superiores, tal como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

- Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden funcionar como uno o más de los siguientes: (1) agentes de carga, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que evitan la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alcoholes azucarados polihidroxilados (anteriormente citados); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; azúcares orgánicos o alcoholes azucarados tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquirosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre,

65

tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Los tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes mojantes") pueden estar presente para ayudar a solubilizar el agente terapéutico así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, que también permite que la formulación se exponga a la tensión de cizallamiento superficial sin producir la desnaturalización de la proteína o anticuerpo terapéutico activo. Los tensioactivos no iónicos están presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml o de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml. En algunas realizaciones, los tensioactivos no iónicos están presentes en un intervalo de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente un 0,1 % p/p, o de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente un 0,1 % p/v.

Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, etc.), poloxámeros (184, 188, etc.), polioles PLURONIC®, TRITON®, monoéteres de sorbitán polioxietilenados (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.), lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de sacarosa ácido graso, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Los detergentes aniónicos que se pueden usar incluyen laurilsulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato de sodio y dioctil sulfonato de sodio. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio.

Para que las formulaciones se utilizar para administración *in vivo*, deben ser estériles. La formulación se puede convertir en estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas del presente documento generalmente se introducen en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable mediante una jeringuilla de inyección hipodérmica.

La vía de administración se establece de acuerdo con métodos conocidos y aceptados, tales como bolo individual o múltiple o infusión durante un periodo de tiempo prolongado de una forma adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vía subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o mediante liberación extendida o liberación prolongada.

La formulación del presente documento puede contener también más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. De forma alternativa o adicional, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

40 V. Métodos de tratamiento

Se divulgan en el presente documento métodos para tratar o prevenir una enfermedad mediada por células que expresan Siglec-8 en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado) o composiciones del mismo. En algunos casos, el sujeto (por ejemplo, un paciente humano) ha recibido un diagnóstico de un trastorno mediado por eosinófilos o está en riesgo de desarrollar el trastorno mediado por eosinófilos. En algunos casos, el sujeto (por ejemplo, un paciente humano) ha recibido un diagnóstico de un trastorno mediado por mastocitos o está en riesgo de desarrollar el trastorno mediado por mastocitos. En algunos casos, el sujeto tiene un trastorno mediado por eosinófilos o un trastorno mediado por mastocitos.

Se divulgan en el presente documento métodos para el agotamiento o la reducción de eosinófilos que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado). En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los eosinófilos se mide comparando la cantidad de población de los eosinófilos de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la población de eosinófilos en una muestra del sujeto antes del tratamiento con el anticuerpo. En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los eosinófilos se mide comparando la cantidad de población de los eosinófilos de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la población de eosinófilos de una muestra de otro sujeto sin el tratamiento con el anticuerpo. En algunos casos, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de pulmón, una muestra de poliposis nasal, etc.). En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los eosinófilos se debe a la apoptosis de los eosinófilos activados. Los eosinófilos se pueden activar o sensibilizar mediante citoquinas u hormonas tales como, aunque no de forma limitativa, IL-5, GM-CSF, IL-33, IFN- γ , TNF- α , y leptina. En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los eosinófilos se debe a la apoptosis de los eosinófilos en reposo. En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los eosinófilos se debe a la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). En algunas realizaciones, se previene o se reduce la producción de eosinófilos desde los mediadores inflamatorios. Los mediadores inflamatorios ilustrativos incluyen, aunque no de forma

limitativa, especies de oxígeno reactivo, proteínas granulares (por ejemplo, proteína catiónica eosinófila, proteína básica mayor, neurotoxina derivada de eosinófilos, peroxidasa de eosinófilos, etc.), mediadores lipídicos (por ejemplo, PAF, PGE1, PGE2, etc.), enzimas (por ejemplo, elastasa), factores de crecimiento (por ejemplo, VEGF, PDGF, TGF- α , TGF- β , etc.), quimioquinas (por ejemplo, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP4, eotaxina, etc.) y citoquinas (por ejemplo, IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-33, TNF- α , etc.).

También se divulgan en el presente documento métodos para el agotamiento o la reducción de mastocitos que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado). En algunos casos, el agotamiento o la reducción de mastocitos se mide comparando la cantidad de población de mastocitos de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo y la cantidad de población de mastocitos en una muestra de un sujeto antes del tratamiento con el anticuerpo. En algunos casos, el agotamiento o la reducción de mastocitos se mide comparando la cantidad de población de mastocitos de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la cantidad de población de mastocitos en una muestra de otro sujeto sin el tratamiento con anticuerpo o con la cantidad de población de mastocitos promedio en muestras sin el tratamiento con anticuerpo. En algunos casos, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de piel, una muestra de pulmón, una muestra de médula ósea, una muestra de poliposis nasal, etc.). En algunos casos, la muestra es una muestra de fluido biológico (por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de lavado broncoalveolar y una muestra de lavado nasal). En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los mastocitos se debe a la citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC). En algunos casos, el agotamiento o la reducción de los mastocitos es la reducción o la prevención de mediadores inflamatorios de formación nueva o preformados producidos en los mastocitos. Los mediadores inflamatorios ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, histamina, n-metil histamina, enzimas (por ejemplo, triptasa, quimasa, catespina G, carboxipeptidasa, etc.), mediadores lipídicos (por ejemplo, prostaglandina D2, prostaglandina E2, leucotrieno B4, leucotrieno C4, factor activador de plaquetas, 11-beta-prostaglandina F2, etc.), quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 (es decir, eotaxina), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10, etc.), y citoquinas (por ejemplo, IL-3, IL-4, IL-5, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF, etc.).

También se divulgan en el presente documento métodos para agotar los mastocitos que expresan Siglec-8 en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado), en el que el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 destruye los mastocitos que expresan Siglec-8 mediante la actividad ADCC. En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 agota al menos 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 % de los mastocitos que expresan Siglec-8 en una muestra obtenida del sujeto en comparación con un nivel de valor inicial antes del tratamiento. En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 agota al menos aproximadamente un 20 % de los mastocitos que expresan Siglec-8 en una muestra obtenida del sujeto en comparación con un nivel de valor inicial antes del tratamiento. En algunos casos, el agotamiento o destrucción de mastocitos se mide comparando la cantidad de población de mastocitos en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo y la cantidad de población de mastocitos en una muestra de un sujeto antes del tratamiento con el anticuerpo. En algunos casos, el agotamiento o destrucción de mastocitos se mide comparando la cantidad de población de mastocitos de una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de fluido biológico) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la cantidad de población de mastocitos en una muestra de otro sujeto sin el tratamiento con anticuerpo o con la cantidad de población de mastocitos promedio en muestras sin el tratamiento con anticuerpo. En algunos casos, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de piel, una muestra de pulmón, una muestra de médula ósea, una muestra de poliposis nasal, etc.). En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de fluido biológico (por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de lavado broncoalveolar y una muestra de lavado nasal). En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 se ha diseñado mediante ingeniería genética para mejorar la actividad ADCC. En algunos casos, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad ADCC. En algunos casos, al menos una o dos de las cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada. En algunos casos, el agotamiento o destrucción de los mastocitos es la reducción o la prevención de mediadores inflamatorios de formación nueva o preformados producidos en los mastocitos. Los mediadores inflamatorios ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, histamina, n-metil histamina, enzimas (por ejemplo, triptasa, quimasa, catespina G, carboxipeptidasa, etc.), mediadores lipídicos (por ejemplo, prostaglandina D2, prostaglandina E2, leucotrieno B4, leucotrieno C4, factor activador de plaquetas, 11-beta-prostaglandina F2, etc.), quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 (es decir, eotaxina), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10, etc.), y citoquinas (por ejemplo, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF, etc.).

También se divulgan en el presente documento métodos para inhibir la actividad mediada por mastocitos que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento (por ejemplo, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado). En algunos casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos se mide comparando la actividad mediada por mastocitos en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de sangre) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la actividad mediada por mastocitos en una muestra de un sujeto antes del tratamiento con el anticuerpo. En algunos

casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos se mide comparando la actividad mediada por mastocitos en una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de sangre) de un sujeto después del tratamiento con el anticuerpo con la actividad mediada por mastocitos en una muestra de otro sujeto sin el tratamiento con el anticuerpo o con la actividad mediada por mastocitos promedio en muestras procedentes de sujetos sin el tratamiento con anticuerpos. En algunos casos, la muestra es una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de piel, una muestra de pulmón, una muestra de médula ósea, una muestra de poliposis nasal, etc.). En algunos casos, la muestra es una muestra de fluido biológico (por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de lavado broncoalveolar y una muestra de lavados nasales). En algunos casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos es la inhibición de la desgranulación de los mastocitos. En algunos casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos es la inhibición de la contracción del músculo liso de las vías respiratorias. En algunos casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos es la inhibición de la entrada de calcio en los mastocitos. En algunos casos, la inhibición de la actividad mediada por mastocitos es la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios de formación nueva o preformados producidos en los mastocitos. Los mediadores inflamatorios ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, histamina, n-metil histamina, enzimas (por ejemplo, tripsina, quimasa, catépsina G, carboxipeptidasa, etc.), mediadores lipídicos (por ejemplo, prostaglandina D2, prostaglandina E2, leucotrieno B4, leucotrieno C4, factor activador de plaquetas, 11-beta-prostaglandina F2, etc.), quimioquinas (por ejemplo, CCL2, CCL3, CCL4, CCL11 (es decir, eotaxina), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL10, etc.), y citoquinas (por ejemplo, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, IL-15, IL-33, GM-CSF, TNF, etc.).

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada de un principio activo, dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, tratamientos anteriores, los antecedentes clínicos del sujeto y la respuesta al agente, y el criterio del médico a cargo del tratamiento. El agente se administra adecuadamente al sujeto de una vez o en una serie de tratamientos. En algunos casos de los métodos descritos en el presente documento, el intervalo entre administraciones de un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento es de aproximadamente un mes o más prolongado. En algunos casos, el intervalo entre administraciones es aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses, aproximadamente seis meses o un periodo de tiempo más prolongado. Tal como se utiliza en el presente documento, un intervalo de tiempo entre administraciones se refiere al período de tiempo entre una administración del anticuerpo y la siguiente administración del anticuerpo. Tal como se utiliza en el presente documento, un intervalo de aproximadamente un mes incluye cuatro semanas. Por consiguiente, en algunos casos, el intervalo entre administraciones es aproximadamente cuatro semanas, aproximadamente ocho semanas, aproximadamente doce semanas, aproximadamente dieciséis semanas, aproximadamente veinte semanas, aproximadamente veinticuatro semanas o un periodo de tiempo más prolongado. En algunos casos, el tratamiento incluye múltiples administraciones del anticuerpo, en el que el intervalo entre administraciones pueden variar. Por ejemplo, el intervalo entre la primera administración y la segunda administración es de aproximadamente un mes, y los intervalos entre las posteriores administraciones son aproximadamente tres meses. En algunos casos, el intervalo entre la primera administración y la segunda administración es de aproximadamente un mes, el intervalo entre la segunda administración y la tercera administración es de aproximadamente dos meses, y los intervalos entre las posteriores administraciones son aproximadamente tres meses. En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se administra a una dosis continua. En algunas realizaciones, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se administra a un sujeto a una dosificación de aproximadamente 150 a aproximadamente 450 mg por dosis. En algunas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 se administra a un sujeto a una dosificación de cualquiera de aproximadamente 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, y 450 mg por dosis. En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se administra a un sujeto a una dosificación de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg o de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. En algunos casos, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento se administra a un sujeto a una dosificación de aproximadamente cualquiera de 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,0 mg/kg, 3,5 mg/kg, 4,0 mg/kg, 4,5 mg/kg, 5,0 mg/kg, 5,5 mg/kg, 6,0 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,0 mg/kg, 7,5 mg/kg, 8,0 mg/kg, 8,5 mg/kg, 9,0 mg/kg, 9,5 mg/kg, o 10,0 mg/kg. Se puede usar cualquiera de la frecuencia de dosificación anteriormente descrita.

Un método de tratamiento considerado en el presente documento es el tratamiento de trastornos mediados por eosinófilos y/o trastornos mediados por mastocitos con un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento. Los trastornos mediados por eosinófilos incluyen un trastorno o enfermedad asociados con una migración, quimiotaxia, generación o granulación de eosinófilos. Análogamente, los trastornos mediados por mastocitos incluyen un trastorno o enfermedad asociados con una migración, quimiotaxia, generación o granulación de mastocitos. Los trastornos mediados por eosinófilos o los trastornos mediados por mastocitos que se pueden tratar con las formulaciones de la presente invención incluyen asma, rinitis alérgica, poliposis nasal, dermatitis atópica, urticaria crónica (por ejemplo, urticaria idiopática crónica y urticaria crónica espontánea), mastocitosis, leucemia eosinófila, y síndrome hipereosinófilo. Los trastornos mediados por eosinófilos o los trastornos mediados por mastocitos que se pueden tratar con las formulaciones de la presente invención también incluyen asma pauci-granulocítica, hipersensibilidad de las vías aéreas aguda o crónica, esofagitis eosinófila, síndrome de Churg-Strauss, inflamación asociada con una citoquina, inflamación asociada con células que expresan Siglec-8, neoplasia asociada con células que expresan Siglec-8, urticaria física, urticaria por frío, urticaria por presión, penfigoide ampolloso, alergia alimentaria, y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

En algunos casos de los métodos del presente documento, un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 proporcionado en el presente documento inhibe uno o más síntomas de una reacción alérgica. En algunas realizaciones, la reacción alérgica es una reacción de hipersensibilidad de Tipo I.

5 La rinitis alérgica, también conocida como rinoconjuntivitis alérgica o fiebre del heno, es la manifestación más común de una reacción atópica a alérgenos inhalados, cuya gravedad y duración frecuentemente se correlaciona con la intensidad y duración de la exposición al alérgeno. Se trata de una enfermedad crónica, cuya primera aparición puede producirse a cualquier edad, sin embargo, la presentación es normalmente durante la infancia o la adolescencia. Un
10 ataque típico consiste en rinorrea acuosa profusa, estornudos paroxísticos, obstrucción nasal y picor de nariz y paladar. El drenaje del moco postnasal también produce dolor de garganta, carraspeo y tos. También puede haber síntomas de blefaroconjuntivitis alérgica, con intenso picor de la conjuntiva y los párpados, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia. Los ataques graves suelen ir acompañados de un malestar sistémico generalizado, debilidad, fatiga y, en ocasiones, dolores musculares tras períodos intensos de estornudo.

15 El asma, también conocida como enfermedad de las vías respiratorias obstructiva reversible, se caracteriza por la hiperreactividad del árbol traqueobronquial a agentes irritantes respiratorios y sustancias químicas broncoconstrictoras, que produce ataques de sibilancias, disnea, opresión en el pecho y tos que revierten espontáneamente o con tratamiento. Se trata de una enfermedad crónica que afecta a la totalidad de las vías
20 respiratorias, pero que varía en gravedad desde episodios transitorios leves ocasionales a obstrucción bronquial crónica grave que supone una amenaza para la vida. Los signos físicos de un ataque de asma incluyen taquipnea, sibilancias audibles, y el uso de los músculos auxiliares de la respiración. El pulso rápido y una presión arterial elevada también suelen estar presentes, así como elevados niveles de eosinófilos en la sangre periférica y las secreciones nasales. El asma y la atopia pueden coexistir, pero solo aproximadamente la mitad de los asmáticos son también
25 atópicos, e incluso un menor porcentaje de pacientes atópicos también tiene asma. Sin embargo, la atopia y el asma no son totalmente independiente ya que el asma aparece con más frecuencia entre atópicos que entre individuos no atópicos, especialmente durante la infancia. El asma se ha dividido tradicionalmente en dos subgrupos, asma extrínseca y asma intrínseca. Además, el asma implica una inflamación crónica de las vías respiratorias, reagudizaciones que varían en frecuencia entre los distintos pacientes y en respuesta a frecuencia ambientales. En
30 los casos graves, se puede producir una remodelación crónica de las vías respiratorias.

El asma extrínseca, también conocida como asma alérgica, atópica o inmunitaria, es descriptiva de pacientes que suelen desarrollar asma en una etapa temprana de la vida, habitualmente durante la lactancia o la infancia. Otras manifestaciones de la atopia, incluidos eccema o rinitis alérgica a menudo coexisten. Los ataques asmáticos pueden
35 producirse durante las temporadas de polen, en presencia de animales, o exposición al polvo doméstico, almohadas de plumas, u otros alérgenos. Las pruebas cutáneas muestran reacciones de tipo roncha frente a los alérgenos causantes. De forma interesante, las concentraciones de IgE sérica total frecuentemente están elevadas, pero a veces son normales. El asma intrínseca, también conocida como asma no alérgica o asma idiopática, se produce de forma típica durante la edad adulta por primera vez, después de un aparente infección de las vías respiratorias. Los síntomas
40 incluyen obstrucción bronquial crónica o recurrente no relacionada con temporadas de polen o exposición a otros alérgenos. Las pruebas cutáneas son negativas a los alérgenos atópicos habituales, la concentración de IgE sérica es normal. Los síntomas adicionales incluyen sangre y eosinofilia en el esputo. Para los fines de esta solicitud de patente, "trastornos mediados por eosinófilos" incluyen asma tanto alérgica y como no alérgica. En algunas realizaciones, un sujeto con uno o varios trastornos mediados por eosinófilos y/o r(s) uno o varios trastornos mediados por mastocitos padece de un asma que no está adecuadamente controlada por un corticoesteroide inhalado, un agonista β_2 de acción
45 corta, un agonista β_2 de acción prolongada, o una combinación de los mismos.

La dermatitis atópica, también conocida como eccema, neurodermatitis, eccema atópico o prurigo de Besnier, es un trastorno cutáneo crónico habitual específico de un subconjunto de pacientes con rasgos familiares e inmunitarios de
50 atopia. El rasgo esencial es una respuesta inflamatoria pruriginosa dérmica, que induce una erupción cutánea característica simétricamente distribuida con predominio de determinados sitios. Aunque la dermatitis atópica se clasifica como una forma cutánea de la atopia porque está asociada con la rinitis alérgica y el asma y elevados niveles de IgE, la gravedad de la dermatitis, sin embargo, no siempre se correlaciona con la exposición a los alérgenos en las pruebas cutáneas y la desensibilización (al contrario de lo que sucede en otras enfermedades alérgicas) no es un
55 tratamiento eficaz. Aunque niveles séricos elevados de IgE es una confirmación de un diagnóstico de asma alérgica, los niveles normales no lo impiden. La presentación de la enfermedad se puede producir a cualquier edad, y las lesiones comienzan de forma aguda con pápulas edematosas eritematosas o con placas córneas. El picor provoca rascado y la formación de costras, después liquenificación crónica. A nivel celular, la lesión aguda es edemosa y la dermis se infiltra con células mononucleares, linfocitos CD4. Los neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas y basófilos son raros, sin embargo, los mastocitos desgranulados están presentes. Las lesiones crónicas presentan hiperplasia epidérmica, hiperqueratosis y paraqueratosis, y la dermis se infiltra de células mononucleares, células de Langerhans y mastocitos. También puede haber áreas focales de fibrosis, incluida la implicación del perineuro de los nervios pequeños.

65 Urticaria y angioedema se refieren al hinchamiento físico, siendo el eritema y el prurito el resultado del receptor estimulado por histaminas en los vasos sanguíneos cutáneos superficiales, y es el rasgo cutáneo distintivo de la

anafilaxia sistémica. La anafilaxia sistémica es la aparición de una reacción mediada por IgE simultáneamente en múltiples órganos resultado de un fármaco, veneno de insecto o alimento. Está causada repentinamente por alérgenos inducidos, mastocitos cargados de IgE, que da como resultado una alteración intensa en el funcionamiento de varios órganos vitales que supone una amenaza para la vida. El colapso vascular, la obstrucción aguda de las vías respiratorias, la vasodilatación cutánea y el edema, así como espasmos de la musculatura genitourinaria y gastrointestinal pueden aparecer casi simultáneamente, aunque no siempre en el mismo grado. La patología de la anafilaxia incluye angioedema e hiperdistensión pulmonar, con taponamiento mucoso de las vías respiratorias y atelectasia focal. A nivel celular, los pulmones aparecen de manera similar a como se presentan durante un ataque de asma aguda, con hipersecreción de las glándulas submucosas bronquiales, edema mucosal y submucosal, congestión vascular peribronquial y eosinofilia en las paredes bronquiales. Pueden estar presentes edema y hemorragia pulmonar. Los espasmos de los músculos bronquiales, la hiperdistensión, e incluso la rotura del alvéolos, también pueden estar presentes. Los rasgos importantes de la anafilaxia humana incluyen edema, congestión vascular y eosinofilia en la lámina propia de la laringe, tráquea, epiglotis e hipofaringe. La exposición al alérgeno puede ser mediante ingestión, inyección o contacto con la piel o la membrana mucosa. La reacción se inicia segundos o minutos después de la exposición al alérgeno. Es posible que se produzca un susto inicial o sensación de fatalidad inminente, seguido rápidamente por síntomas en uno o más sistemas de órganos diana: cardiovascular, respiratorio, cutáneo o gastrointestinal. Los alérgenos responsables de la anafilaxia son diferentes de los que se asocian habitualmente con la atopía. Alimentos, fármacos, venenos de insectos o látex son las fuentes habituales. Los alérgenos alimentarios incluyen los que aparecen en crustáceos, moluscos (por ejemplo, langostas, gambas, cangrejos), pescado, leguminosas (por ejemplo, cacahuetes, guisantes, judías, regaliz), semillas (por ejemplo, sésamo, semillas de algodón, alcaravea, mostaza, lino, girasol), frutos secos, bayas, clara de huevo, trigo sarraceno y leche. Los alérgenos de fármacos incluyen los que aparecen en proteínas y polipéptidos heterólogos, polisacáridos y fármacos hapténicos. Los alérgenos de insectos incluyen los insectos himenópteros, incluida la abeja melífera, avispa amarilla, avispa, avispa y hormiga roja. Aunque la epinefrina es el tratamiento habitual para la anafilaxia, la antihistamina u otros bloqueantes de la histamina se prescriben habitualmente para la urticaria o la reacción angioedémica menos grave.

La poliposis nasal es una enfermedad inflamatoria crónica del tracto respiratorio superior caracterizado por un crecimiento del tejido inflamado hacia la cavidad nasal, y aunque la etiología exacta se desconoce, se sabe que tiene una prevalencia entre el 1 y 5 % de los adultos (Settipane G A: Epidemiology of nasal polyps. *Allergy Asthma Proc*, 1996, 17:231-236). La poliposis nasal se presenta de forma típica en varones de 20 años de edad o mayores y produce obstrucción nasal, hiposmia, e infecciones recurrentes con un impacto significativamente superior sobre la calidad de vida que la rinitis alérgica perenne (Li et al., Characterizing T-Cell Phenotypes in Nasal Polyposis in Chinese Patients, *J Investig Allergol Clin Immunol*, 2009; Vol. 19(4):276-282). Hasta un tercio de todos los pacientes con poliposis nasales informan tener asma, sin embargo, solamente el 7 % de los pacientes con asma tienen poliposis nasal. Los tipos de células predominantes en la poliposis nasal incluyen los eosinófilos y los mastocitos.

VI. Artículos de fabricación o kits

En otro aspecto, se proporciona un artículo de fabricación o kit que comprende un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 descrito en el presente documento. El artículo de fabricación o kit puede comprender además instrucciones para usar el anticuerpo en los procedimientos de la invención. Así, en determinados casos, el artículo de fabricación o kit comprende instrucciones para usar un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 en métodos para tratar o prevenir un trastorno mediado por eosinófilos y/o un trastorno mediado por mastocitos en un individuo que comprende administrar al individuo una cantidad eficaz del anticuerpo dirigido contra Siglec-8. En determinados casos, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el individuo tiene una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste de asma, rinitis alérgica, poliposis nasal, dermatitis atópica, urticaria crónica, mastocitosis, leucemia eosinófila, y síndrome hipereosinófilo. En determinados casos, el individuo tiene una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste de asma pauci-granulocítica, hipersensibilidad de las vías aéreas aguda o crónica, esofagitis eosinófila, síndrome de Churg-Strauss, inflamación asociada con una citoquina, inflamación asociada con células que expresan Siglec-8, neoplasia asociada con células que expresan Siglec-8, urticaria física, urticaria por frío, urticaria por presión, penfigoide ampolloso, alergia alimentaria, y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

El artículo de fabricación o kit puede comprender además un recipiente. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de cámara doble), jeringas (tales como jeringuillas de cámara simple o doble) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado a partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación.

El artículo de fabricación o kit puede comprender además una etiqueta o un prospecto, que está sobre o asociado al recipiente, puede indicar directrices para la reconstitución y/o el uso de la formulación. La etiqueta o el prospecto pueden indicar además que la formulación es útil o está prevista para uso subcutáneo, intravenoso, y otros modos de administración para tratar o prevenir un trastorno mediado por eosinófilos y/o un trastorno mediado por mastocitos en un individuo. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de un solo uso o un vial multiuso, que permite repetir las administraciones de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación o el kit puede también comprender un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado. El artículo de fabricación o el kit puede también comprender otros materiales deseables desde un punto de vista comercial, terapéutico y del usuario, que

incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

En un caso específico, la presente invención proporciona kits con una unidad de administración en monodosis. Estos kits comprenden un recipiente de una formulación acuosa de anticuerpo terapéutico, incluidas las jeringuillas precargadas de una sola cámara o multicámara. Jeringuillas precargadas ilustrativas están comercialmente disponibles de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

El artículo de fabricación o kit del presente documento comprende opcionalmente, además, un recipiente que comprende un segundo medicamento, en el que el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 es un primer medicamento, y en donde el artículo o kit comprende adicionalmente instrucciones en la etiqueta o el prospecto para tratar el sujeto con el segundo medicamento, en una cantidad eficaz. Un segundo medicamento ilustrativo puede ser un anticuerpo dirigido contra IgE, una antihistamina, un broncodilatador, un glucocorticoide, un AINE, un descongestivo, un supresor de la tos, un analgésico, un antagonista de TNF, un antagonista de la integrina, un agente inmunosupresor, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-4/IL-13 doble, un DMAED, un anticuerpo que se une a un marcador de superficie de linfocitos B y/o un antagonista de BAFF.

En otra realización, lo que se proporciona en el presente documento es un artículo de fabricación o kit que comprende las formulaciones descritas en el presente documento para su administración en un dispositivo autoinyector. Un autoinyector se puede describir como un dispositivo de inyección que, tras la activación, administrará su contenido sin acción adicional necesaria por parte del paciente o administrador. Están especialmente bien adecuados para la automedicación de formulaciones terapéuticas cuando la velocidad de administración debe ser constante y el tiempo de administración es mayor que unos pocos momentos.

La invención se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento tienen fines ilustrativos únicamente y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a los expertos en la materia a la luz de los mismos.

Ejemplos

Las siglecs (lectinas de tipo inmunoglobulina de unión al ácido siálico) son proteínas de la superficie celular transmembrana de un solo paso que se encuentran predominantemente sobre los leucocitos. Siglec-8, un miembro de la familia Siglec, se descubrió en primer lugar como parte de los esfuerzos por identificar novedosas proteínas eosinófilas. Además de la expresión con eosinófilos humanos, también se expresan en los mastocitos. Siglec-8 reconoce un glicano sulfatado, 6'-sulfo-sialilo Lewis X, y contiene un motivo inhibidor basado en tirosina del inmunorreceptor intracelular (ITIM) del que se ha comprobado que inhibe la función de los mastocitos. Los anticuerpos murinos contra Siglec-8, los anticuerpos 2E2 y 2C4, se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 8.207.305; la patente de Estados Unidos n.º 8.197.811, la patente de Estados Unidos n.º 7.871.612, y la patente de Estados Unidos n.º 7.557.191. La secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 2C4 de ratón se puede encontrar, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 8.207.305 como las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente.

Ejemplo 1: Generación y caracterización de anticuerpos contra Siglec-8 quiméricos.

Los anticuerpos quiméricos se generaron a partir del anticuerpo 2E2 de ratón y el anticuerpo 2C4 de ratón, y posteriormente se analizaron para determinar su actividad de unión contra Siglec-8 humana.

Métodos y resultados

Generación del anticuerpo 2E2 quimérico (ch2E2) y del anticuerpo 2C4 quimérico (ch2C4)

Para la generación de un anticuerpo 2E2 quimérico (ch2E2), lisados de células 2E2 de hibridoma de ratón congelados rápidamente se procesaron mediante el RNeasy Mini kit (Qiagen) para aislar el ARN total de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una muestra de 3 µg de ARN aislado se transcribió de forma inversa para producir ADNc de 2E2 usando el kit de síntesis de la 1ª hebra de ADNc (GE Life Sciences) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Posteriormente, el ADNc de 2E2 se amplificó mediante la PCR usando la mezcla maestra Phusion Flash High-Fidelity PCR (Thermo Scientific) y se confirmaron las secuencias de las reacciones de la PCR. El ADNc de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (VH) y de la región variable de la cadena ligera kappa (VL) se amplificaron utilizando la PCR usando la mezcla maestra Phusion High-Fidelity PCR. El resultado de cada reacción de PCR fue un único producto de amplificación que se purificó usando el kit de purificación QIAquick PCR Purification (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante y se obtuvo la secuencia de cada cadena de la inmunoglobulina. La secuencia de consenso de la región variable de la cadena kappa se designó como 2E2 VK y la secuencia de consenso de la región variable de la cadena pesada se designó como 2E2 VH. La secuencia de la proteína 2E2 VK fue idéntica a la del anticuerpo 2C4 IgG1 de ratón (véase Kikly et al., *J. Allergy Clin Immunol.*, 2000; 105:1093-1100) salvo por el primer resto, donde Gln estaba sustituido por Glu mientras que la secuencia de la proteína 2E2 VH era totalmente idéntica a la de 2C4.

La construcción de los vectores de expresión quiméricos conllevó la clonación de las regiones variables amplificadas en vectores de la región constante IgG/kappa usando clonación independiente de ligasa. En resumen, los vectores pCMV se digirieron con BfuA1 (BsPM1), el vector digerido se purificó mediante electroforesis en gel, y los salientes compatibles en el vector se generaron por incubación con ADN polimerasa T4 y dATP 100 mM. Para la inserción, las secuencias del anticuerpo se amplificaron mediante la PCR a partir del ADNc de 2E2 con cebadores que contenían el extremo 3' de la secuencia líder, es decir, el cebador directo, o el principio de la región constante (IgG1 o kappa), es decir, el cebador inverso, seguido por el comienzo de la región variable (en cada dirección). Las inserciones amplificadas se purificaron usando un kit de purificación de la PCR (Qiagen) y los salientes complementarios se generaron en la inserción por incubación con ADN polimerasa T4 y dATP 100 mM. El vector y las inserciones se incubaron a temperatura ambiente y se usaron para transformar bacterias TOP 10 químicamente competentes (Invitrogen) que posteriormente se sembraron en placas de cultivo que contenían kanamicina. Se aislaron varios clones, y las colonias se cribaron mediante PCR. Los clones que contenían los productos de la PCR correctamente dimensionados se seleccionaron, El ADN se aisló usando un kit miniprep (Qiagen) y el ADN se secuenció.

Para la generación de un anticuerpo 2C4 quimérico (ch2C4), la región variable de la cadena pesada de 2C4 (VH) y la región variable de la cadena ligera kappa (VK) se sintetizaron (GeneScript) y se aplicó el mismo método que el utilizado para clonar el anticuerpo 2E2 quimérico. Una suspensión de células Expi293 (células de riñón embrionario humano) crecidas en medio de transfección Expi293 (Invitrogen) y antibióticos se transfectaron simultáneamente con construcciones que codificaban la cadena pesada de ch2E2 y la cadena ligera kappa de ch2E2 o construcciones que codificaban la cadena pesada de ch2C4 y la cadena ligera kappa de ch2C4 (1 µg de cada uno) usando el reactivo ExpiFectamine 293 provisto del kit Expi293 Expression System (Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Las células se hicieron crecer en 2 ml de medio de cultivo en placas de seis pocillos durante 7 días antes de recoger el medio y analizarse para determinar la expresión de la proteína recombinante mediante ELISA.

Actividad de unión a Siglec-8 del anticuerpo quimérico

La unión del dominio extracelular (ECD) de la Siglec-8 recombinante humana a los anticuerpos IgG1K de 2E2 quimérico y 2C4 quimérico se midió mediante ELISA. Para el ensayo de unión a Siglec-8, se preparó una placa de 384 pocillos SpectraPlate (Perkin Elmer) por revestimiento con 30 µl por pocillo de 0,4 µg/ml de Siglec-8 ECD durante la noche a 4 °C, seguido de la retirada de la solución de revestimiento por lavado de los pocillos con tampón de lavado (Tween 20 al 0,1 %) y bloqueo con 90 µl de solución BSA/TBS al 5 % durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones en serie de tres veces de un anticuerpo quimérico (ch2E2 o ch2C4) o de anticuerpo de ratón (m2E2 o m2C4) en BSA/TBS al 0,2 % (la concentración de partida fue de 5000 ng/ml) a cada pocillo revestido. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y los pocillos posteriormente se lavaron antes de la adición de anticuerpo de cabra dirigido contra Fc humano conjugado con peroxidasa (dilución 1:10000) o dirigido contra Fc de ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:30000) diluido en solución de BSA/TBS al 0,2 %. La placa se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente, seguido por lavado y adición de 30 µl de sustrato K-blue HRP (SkyBio Ltd) a cada pocillo. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos, la reacción se detuvo mediante la adición de 10 µl de solución Red Stop (SkyBio Ltd) a cada pocillo. La densidad óptica de las muestras experimentales se leyó a 650 nm usando el lector de ELISA PHERAStar FS (BMG Labtech).

Ambos anticuerpos quiméricos se unieron a ECD de Siglec-8 completa con valores de CE₅₀ comparables. El anticuerpo quimérico ch2E2 se unió a ECD de Siglec-8 con un valor de CE₅₀ inferior, en comparación con el anticuerpo m2E2 de ratón (Tabla 2).

Tabla 2. Unión del anticuerpo a ECD de Siglec-8 humana.

	m2E2	ch2E2 purificado	ch2E2	ch2C4
EC50	0,1003	0,05701	0,04759	0,07411

Ejemplo 2: Generación y caracterización de anticuerpos contra Siglec-8 humanizados.

La secuencia del anticuerpo quimérico 2E2 y del anticuerpo quimérico 2C4 se usó para diseñar versiones humanizadas de los anticuerpos 2E2 de ratón.

Métodos y resultados

Diseño de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 humanizados

Las secuencias de las inmunoglobulinas humanas y de ratón procedentes de la International Immunogenetics Database 2009 (Lefranc, MP., *Nucleic Acid Res.*, 2003, 31(1):307-10) y de la Kabat Database Release 5 de Sequences of Proteins of Immunological Interest (última actualización 17-Nov-1999) (Kabat et al., NIH National Technical Information Service, 1991, 1-3242) se usaron para compilar una base de datos de secuencias de inmunoglobulina humana con alineamiento de Kabat. La base de datos compilada contenía 10.906 secuencias VH y 2.912 secuencias VK.

Se había calculado un modelo de analogía de las regiones variables del anticuerpo 2C4 de ratón utilizando el programa Modeller (Eswar et al., *Curr. Protoc. Bioinformatics*, 2006, Cap. 5 Unidad 5.6) incluido en el paquete Discovery Studio (Accelrys, Inc.). Las coordenadas atómicas de 1a7O.pdb, 1dqd.pdb y 1ORS.pdb eran las plantillas de identidad de la secuencia marco más altos para VH, VL y cadena principal/interfase, respectivamente, tal como se determina mediante análisis con la Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de la base de datos de estructuras pdb del anticuerpo PDB estructuras base de datos (Accelrys, Inc.). Estas plantillas se utilizaron para generar 30 modelos iniciales del marco y el modelo de menor energía se utilizó para generar 20 modelos del bucle (con todos los bucles de la CDR incluidos), con sus 5 mejores plantillas de bucle, usando la definición de Kabat para en su caso generar un modelo final de 2C4 de ratón.

La humanización necesitó la identificación de regiones V humanas adecuadas. El programa de análisis de secuencia de Gibbs (MRCT) se usó para interrogar bases de datos de VH y VK humanas con las secuencias de proteína VH y VK de 2C4 usando diferentes criterios de selección. Usando el programa Discovery Studio (Accelrys), se identificaron los restos del marco (FW) a una distancia de 4Å de los restos de la CDR (definición de Kabat) en el modelo de homología final del anticuerpo 2C4 de ratón, y se designaron como "envoltura de la CDR a 4Å". No había secuencias de VH humanas que compartieran identidad de longitud de la CDR 1, 2 y 3 con el 2C4 que tuvieran una elevada envoltura de la CDR a 4Å y/o una identidad VCI con 2C4 VH. AF471521 fue el siguiente mejor candidato con un tamaño de la CDR3 de 14 restos con la mayor puntuación de identidad de los restos clave del marco (19/24 de la envoltura a 4Å y 18/22 VCI), mientras que las demás secuencias presentaban diferencias adicionales, lo que las convertía en una prioridad menor. Sin embargo, AF471521 tenía 11 mutaciones somáticas desde su gen X92218 de VH de la línea germinal. Para mitigar las mutaciones somáticas, cualquier resto del marco que difería de línea germinal y/o que no estaba conservado en el ratón se retromutó a la secuencia de la línea germinal humana. De esta forma, seis restos de la región marco se retromutaron a la línea germinal y los cinco restos restantes que diferían de línea germinal eran restos de la región marco clave y se mantuvieron idénticos a la secuencia de ratón.

Puesto que se había identificado un aceptor adecuado del marco humano usando un modelo de homología del anticuerpo de 2C4, la proteína sintética y la secuencia de ADN se diseñaron mediante injerto de las CDR del anticuerpo de 2E2 sobre el marco humano aceptor. El diseño inicial de 2E2RHA fue el injerto de las CDR 1, 2 y 3 de 2E2 VH en el FW aceptor de AF471521. La intercalación las CDR de 2E2 VH (escala de grises) en la secuencia del FW de AF471521 dio como resultado el diseño de 2E2RHA, la variante humanizada inicial (Fig. 1). Cinco restos de la envoltura de la CDR a 4Å/VCI, en las posiciones de Kabat 24, 48, 49, 67 y 68 no se conservaron en 2E2RHA, y estos se retromutaron al resto equivalente de ratón, en la versión humanizada de 2E2RHB o se mutaron una de cada vez en las siguientes variantes: las secuencias se ensamblaron *in silico* y se designaron como 2E2RHA a 2E2RHG (Fig. 1).

Para humanizar la cadena ligera, se identificó una cadena kappa humana mediante un proceso similar al de la cadena pesada. AY867246 fue la secuencia con mayor identidad para 2E2 VK en la envoltura de la CDR a 4Å/VCI pero tenía seis mutaciones somáticas. AY867246 se descartó en favor de x93721, que contenía 21/25 de la envoltura a 4Å y 15/17 VCI y solamente una mutación somática del gen VK de la línea germinal más cercano, X01668. La región marco de X93721 se usó para diseñar el ADN y proteínas de las construcciones humanas. Las CDR 1, 2 y 3 de 2E2 VK (tono gris) se injertaron en el FW aceptor de X93721 para generar 2E2RKA (Fig. 2). Había 4 restos de la envoltura de la CDR a 4Å sin emparejar, 3, 47, 58 y 71 en 2E2RKA que se retromutaron a los restos equivalentes de ratón en la variante 2E2RKB o individualmente en las siguientes variantes: las secuencias se ensamblaron *in silico* y se designaron como 2E2RKA a 2E2RKG (Fig. 2).

Generación de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 humanizados

Se sintetizaron los genes de 2E2RHA y 2E2RKA (GenScript) y los codones se optimizaron para las secuencias humanas. Las secuencias naturales de la región marco humana de AF471521 y X93721, cadenas pesadas y ligeras, respectivamente, y las secuencias naturales de CDR de ratón se ensamblaron *in silico* y se designaron 2E2RHA a 2E2RHG y 2E2RKA a 2E2RKG. Usando algoritmos informáticos (GenScript), las secuencias se optimizaron mediante mutagénesis silenciosa para utilizar codones preferentemente utilizados por las células humanas y sintetizadas. Las construcciones RHA/B y RKA/B se amplificaron mediante la PCR con cebadores específicos del vector de expresión y de la inserción, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 para la amplificación mediante la PCR de los anticuerpos quiméricos, y se introdujeron en los vectores de la región constante de IgG/kappa mediante reacciones de clonación independientes de ligasa y se usaron para transformar bacterias TOP 10 como se describe en el Ejemplo 1 para la generación de anticuerpos quiméricos. RKA y RHA se modificaron posteriormente mediante mutagénesis por PCR usando el kit QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) según el protocolo del fabricante para obtener todas las variantes de anticuerpos humanos (Fig. 1, Fig. 2, Tabla 3, Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 3. Secuencias de aminoácidos de regiones variables de variantes de anticuerpos quiméricos y humanizados

Nombre del anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
ch2C4	ch2C4 VH	ch2C4 VK
ch2E2	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)

ES 2 758 508 T3

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
cVHKA	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
cVHKB	ch2E2 VH (SEQ ID NO: 1)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HAcVK	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)
HBcVK	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	ch2E2 VK (SEQ ID NO: 15)
HAKA	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HAKB	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HAKC	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HAKD	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HAKE	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HAKF	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HAKG	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HBKA	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HBKB	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HBKC	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HBKD	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HBKE	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HBKF	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HBKG	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HCKA	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HCKB	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HCKC	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HCKD	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HCKE	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HCKF	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HCKG	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HDKA	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HDKB	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HDKC	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HDKD	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HDKE	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HDKF	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HDKG	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HEKA	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HEKB	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HEKC	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HEKD	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HEKE	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HERF	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HEKG	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HFRA	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HFRB	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HFRC	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HFRD	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HFRE	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HFRF	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HFRG	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HGRA	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HGRB	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)

ES 2 758 508 T3

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
HGRC	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HGRD	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HGKE	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HGKF	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HGHG	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HA2KA	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HA2KB	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HB2KA	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
HB2KB	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HB2KF	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HA2KC	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HA2KD	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HA2KE	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HA2KF	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
HA2KG	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
HB2KC	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
HB2KD	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
HB2KE	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
HA2KFmut	2E2 RHA2 (SEQ ID NO: 9)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HB2KFmut	2E2 RHB2 (SEQ ID NO: 10)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HEKAmut	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKA F-Y mut (SEQ ID NO: 23)
HEKFmut	2E2 RHE (SEQ ID NO: 6)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HAKFmut	2E2 RHA (SEQ ID NO: 2)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HBKFmut	2E2 RHB (SEQ ID NO: 3)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HCKFmut	2E2 RHC (SEQ ID NO: 4)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HDKFmut	2E2 RHD (SEQ ID NO: 5)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HFKFmut	2E2 RHF (SEQ ID NO: 7)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
HGKFmut	2E2 RHG (SEQ ID NO: 8)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
RHE Y-VKA	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
RHE Y-VKB	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
RHE Y-VKC	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
RHE Y-VKD	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
RHE Y-VKE	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
RHE Y-VKF	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
RHE Y-VKG	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
RHE E-DKA	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
RHE E-DKB	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
RHE E-DKC	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
RHE E-DKD	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
RHE E-DKE	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
RHE E-DKF	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
RHE E-DKG	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
RHE S-GKA	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
RHE S-GKB	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
RHE S-GKC	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
RHE S-GKD	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)

(continuación)

Nombre del anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	Región variable de la cadena ligera
RHE S-GKE	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
RHE S-GKF	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
RHE S-GKG	2E2 RHE S-G (SEQ ID NO: 11)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
RHE Triple-KA	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKA (SEQ ID NO: 16)
RHE Triple-KB	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKB (SEQ ID NO: 17)
RHE Triple-KC	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKC (SEQ ID NO: 18)
RHE Triple-KD	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKD (SEQ ID NO: 19)
RHE Triple-KE	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKE (SEQ ID NO: 20)
RHE Triple-KF	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKF (SEQ ID NO: 21)
RHE Triple-KG	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKG (SEQ ID NO: 22)
RHE Triple-KFmut	2E2 RHE triple (SEQ ID NO: 14)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
RHE Y-VKFmut	2E2 RHE Y-V (SEQ ID NO: 13)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)
RHE E-DKFmut	2E2 RHE E-D (SEQ ID NO: 12)	2E2 RKF F-Y mut (SEQ ID NO: 24)

Tabla 4. Secuencias de anticuerpos de HVR de 2E2 y variantes de anticuerpos humanizados

Cadena de anticuerpo	HVR1	HVR2	HVR3
<i>Anticuerpo de 2E2</i>			
Cadena pesada	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGSSPYYSMEY SEQ ID NO: 63
Cadena ligera	SATSSVSYMH SEQ ID NO: 64	STSNLAS SEQ ID NO: 65	QQRSSYPFT SEQ ID NO: 66
<i>Variantes de cadena pesada humanizados 2E2 RHA, 2E2 RHB, 2E2 RHC, 2E2 RHD, 2E2 RHE, 2E2 RHF, 2E2 RHG, 2E2 RHA2, y 2E2 RHB2</i>			
Cadena pesada	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGS SPYYY SMEY SEQ ID NO: 63
<i>Variantes de cadena ligera humanizados 2E2 RKA, 2E2 RKB, 2E2 RKC, 2E2 RKD, 2E2 RKE, 2E2 RKF, y 2E2 RKG</i>			
Cadena ligera	SATSSVSYMH SEQ ID NO: 64	STSNLAS SEQ ID NO: 65	QQRSSYPFT SEQ ID NO: 66
<i>Variantes de cadena pesada humanizados 2E2 RHE S-G, 2E2 RHE E-D, 2E2 RHE Y-V, y 2E2 RHE triple</i>			
2E2 RHE S-G	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGS SPYYYGMEY SEQ ID NO: 67
2E2 RHE E-D	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGS SPYYY SMDY SEQ ID NO: 68
2E2 RHE Y-V	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGS SPYYY SMEV SEQ ID NO: 69
2E2 RHE triple	IYGAH SEQ ID NO: 61	VIWAGGSTNYNSALMS SEQ ID NO: 62	DGS SPYYYGMDV SEQ ID NO: 70
<i>Variantes de cadena ligera humanizados 2E2 RKA F-Y y 2E2 RKF F-Y</i>			
2E2 RKA F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO: 64	STSNLAS SEQ ID NO: 65	QQRSSYPYT SEQ ID NO: 71
2E2 RKF F-Y	SATSSVSYMH SEQ ID NO: 64	STSNLAS SEQ ID NO: 65	QQRSSYPYT SEQ ID NO: 71

Tabla 5. Secuencias de anticuerpos de FR de 2E2 y variantes de anticuerpos humanizados

Cadena pesada	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QVQLKESGPGLV PSQSLTITCTVSGFS LT (SEQ ID NO:25)	WVRQPPGKGLEW LG (SEQ ID NO:30)	RLSISKDNSKQV LKINSLQTDDTAL YYCAR (SEQ ID NO:37)	WGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:44)

ES 2 758 508 T3

(continuación)

Cadena pesada	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2 RHA	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHB	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF SLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGLEW LG (SEQ ID NO:32)	RLSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:39)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHC	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAVSGF SLT (SEQ ID NO:27)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHD	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW LS (SEQ ID NO:33)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHF	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RLTISKDNSKNTV YLQMNSLRAEDTA VYYCAR (SEQ ID NO:40)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHG	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VS (SEQ ID NO:31)	RFSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:41)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHA2	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGG SIS (SEQ ID NO:28)	WIRQPPGKGLEWI G (SEQ ID NO:35)	RVTISVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR (SEQ ID NO:42)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46)
2E2 RHB2	QVQLQESGPGLVK PSETLSLTCTVSGF SLT (SEQ ID NO:29)	WVRQPPGKGLEW LG (SEQ ID NO:36)	RLSISKDNSKNQVS LKLSSVTAADTAV YYCAR (SEQ ID NO:43)	WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:46)

ES 2 758 508 T3

(continuación)

Cadena pesada	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2 RHE S-G	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE E-D	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE Y-V	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
2E2 RHE triple	EVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGF SLT (SEQ ID NO:26)	WVRQAPGKGLEW VG (SEQ ID NO:34)	RFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCAR (SEQ ID NO:38)	WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO:45)
Cadena ligera	FR1	FR2	FR3	FR4
2E2	QIILTQSPAIMSASP GEKVSITC (SEQ ID NO:47)	WFQQKPGTSPKLW IY (SEQ ID NO:50)	GVPVRFSGSGSGTS YSLTISRMEAEDA ATYYC (SEQ ID NO:54)	FGSGTKLEIK (SEQ ID NO:59)
RKA	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKB	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRL WIY (SEQ ID NO:52)	GVPARFSGSGSGT DYTLTISSELEPEDF AVYYC (SEQ ID NO:56)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKC	EIILTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:49)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKD	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL WIY (SEQ ID NO:52)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

(continuación)

Cadena pesada	FR1	FR2	FR3	FR4
RKE	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GVPARFSGSGSGT DFTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:57)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD YTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:58)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKG	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WYQQKPGQAPRL LIY (SEQ ID NO:53)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKA F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD FTLTISLEPEDFAV YYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)
RKF F-Y	EIVLTQSPATLSLSP GERATLSC (SEQ ID NO:48)	WFQQKPGQAPRL IY (SEQ ID NO:51)	GIPARFSGSGSGTD YTLTISLEPEDFA VYYC (SEQ ID NO:55)	FGPGTKLDIK (SEQ ID NO:60)

Los clones se secuenciaron y el ADN plásmido de expresión se preparó usando el kit Plasmid Miniprep (Qiagen) o el sistema PureYield Plasmid Maxiprep (Promega) según el protocolo del fabricante. Las preparaciones del plásmido de expresión que codificaban las VH y VK humanizadas o quiméricas se utilizaron para transfectar células Expi293 (Invitrogen) como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Las células se cultivaron durante 7 días en medio exento de suero, después de lo cual, el medio condicionado procedente de las células se recogió y se analizó mediante ELISA para confirmar la producción de anticuerpos.

Unión a Siglec-8 de los anticuerpos codificados mediante construcciones de VH y VK humanizadas

Las cadenas pesadas y ligeras humanizadas básicas se emparejaron con sus homólogos quiméricos en un intento de identificar posibles problemas importantes con el diseño de la humanización. El antígeno Siglec-8 se usó para medir la unión del anticuerpo mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. 2E2RHB, cuando se emparejó con la cadena ligera quimérica, parecía ser más potente que la cadena pesada de RHA, mientras que la construcción de RKB asociada con la construcción de la cadena pesada quimérica (cVH) se unió al antígeno Siglec-8 con mayor potencia que ambas construcciones cVK emparejadas. Estos resultados confirmaron que el diseño de humanización para ambas cadenas pesada y ligera era aproximadamente correcto y todas se unían a Siglec-8, pero que era necesario trabajo adicional para identificar anticuerpos humanizados adicionales con mejores características de unión.

Unión a Siglec-8 de los anticuerpos completamente humanizados combinados con análogos quiméricos

Las cadenas ligera y pesada del anticuerpo completamente humanizado se combinaron y se compararon con el anticuerpo quimérico para determinar si la sustitución de los restos del marco a 4Å y canónico y de los restos de la interfase era suficiente para humanizar 2E2 correctamente. Células Expi293 se transfectaron simultáneamente con combinaciones de diferentes vectores de la cadena ligera humanizada junto con diferentes vectores de la cadena pesada humanizada. El antígeno Siglec-8 se usó para medir la unión del anticuerpo mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 1. La unión de estos anticuerpos a Siglec8 en comparación con el control quimérico mostró que HBKA y HBKB parecían ser mejores combinaciones que HAKA y HAKB (Tabla 6).

Unión a Siglec-8 de los anticuerpos completamente humanizados

5 Para determinar la importancia relativa de las sustituciones de aminoácidos individuales en la cadena pesada, las cadenas pesadas humanizadas RHC (A24V), RHD (V48L), RHE (S49G), RHF (F67L) y RHG (T68S) se expresaron junto con todas las variantes de cadena ligera y se compararon con las versiones RHA y RHB y el anticuerpo quimérico del control. Los resultados de la unión de estos anticuerpos al ECD de Siglec-8 sugirió que todas estas combinaciones de anticuerpos humanizados se unían con Siglec-8 a la misma potencia excepto para las familias RHA, RHF y RHG (con todas las variantes de cadena ligera) (Tabla 6).

10 A continuación se determinó si el cambio de la cadena ligera de RKA a RKB, con sustituciones de aminoácidos individuales, podría afectar a unión con el anticuerpo. La unión de los anticuerpos que consistían en combinaciones de todas las variantes de cadena pesada con las cadenas ligeras RKC (V3I), RKD (V48L), RKE (L47W) y RKF (E58V), en comparación con el anticuerpo quimérico y las versiones RKA y RKB, se sometió a evaluación. No parecía haber una variante de cadena ligera que afectara significativamente el patrón de unión (Tabla 6). Además, la relevancia del resto F71Y de la cadena ligera de la línea germinal (RKG) también se estudió en combinación con todas las variantes de cadena pesada, y los resultados demostraron que este resto generalmente producía una importante disminución en la unión.

20 Aparentemente, HEKA y HEKF eran los mejores anticuerpos candidatos contra Siglec-8. Por tanto, se volvió a realizar un ELISA para volver a analizar los anticuerpos que se unieron con la mayor potencia al antígeno, en comparación con el anticuerpo quimérico, usando HEKA y HEKF como controles. Los resultados indicaron que las diferentes combinaciones de cadenas pesadas humanizadas y ligeras humanizadas se unían de forma similar a Siglec-8, además de las combinaciones con RHA (Tabla 6). Los resultados destacaron que HEKA y HEKF eran candidatos muy buenos y que se comparaban favorablemente con el control positivo quimérico y tenían pocos restos de ratón en las regiones marco.

Generación de 2E2RH versión 2 y variantes de CDR mutadas

30 Se generó una cadena pesada humanizada posterior basándose en el gen de la línea germinal más cercano. La secuencia de IGHV4-59 de la línea germinal, la línea germinal más similar a 2E2VH (FIG. 1), se usó para diseñar el injerto de las CDR de ratón, sintetizadas (GenScript) y preparadas de la misma forma que otras construcciones descritas anteriormente, para generar anticuerpos humanizados para su comparación con la primera versión de las cadenas RHA y RHB. Además, para determinar si el anticuerpo podía tolerar determinados restos de CDR3 cambiados a la línea germinal. Se introdujeron tres mutaciones en la CDR3 de la cadena pesada RHE variante (mutaciones individuales y triples) y una mutación en la CDR3 de la cadena ligera de RKF (Fig. 3) mediante mutagénesis dirigida al sitio. Los anticuerpos que contenían RHE mutado o RKA/RKF mutado se expresaron y se combinaron con el panel completo de la cadena complementaria usando el mismo método que se ha descrito anteriormente.

40 Las CDR de las cadenas pesadas injertadas en la línea germinal humana se compararon con las otras versiones de cadenas pesadas. El injerto directo (RHA2) perturbó completamente la unión con el antígeno y la región marco de la línea germinal, con los restos 4Å/VC1 retromutados al ratón (RHB2) se comportó de forma muy similar al primer RHB pero conteniendo 10 restos de ratón en comparación con los 5 de RHB. Los datos de unión ilustraron la influencia de la introducción de mutaciones en la CDR3 de ambas cadenas y se sugirieron que las mutaciones de la cadena pesada tenía un efecto negativo sobre la unión a Siglec-8, mientras que la mutación en la cadena ligera, por sí misma, no proporcionaba gran mejora, aunque los mejores anticuerpos eran los que contenían RHB (todas las retromutaciones de ratón) y RHE, el candidato de cadena pesada (Tabla 6).

Tabla 6. Unión del anticuerpo a ECD de Siglec-8 humana.

Anticuerpos humanizados							
Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)
HAKA	0,058	HCKA	0,056	HEKA	0,112	HGKA	0,061
HAKB	0,071	HCKB	0,065	HEKB	0,057	HGKB	0,134
HAKC	0,066	HCKC	0,058	HEKC	0,065	HGKC	0,065
HAKD	0,058	HCKD	0,049	HEKD	0,070	HGKD	0,047
HAKE	0,052	HCKE	0,059	HEKE	0,205	HGKE	0,116
HAKF	0,062	HCKF	0,050	HEKF	0,097	HGKF	0,088
HAKG	0,189	HCKG	0,273	HEKG	0,302	HGKG	0,254
HBKA	0,070	HDKA	0,067	ch2E2 Purif.	0,062	VHVK	0,043
HBKB	0,056	HDKB	0,055			cVHKA	NA
HBKC	0,033	HDKC	0,057			cVHKB	0,027

(continuación)

Anticuerpos humanizados							
Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)
HBKD	0,039	HDKD	0,048			HAcVK	0,067
HBKE	0,061	HDKE	0,065			HBcVK	0,066
HBKF	0,051	HDKF	0,057			ch2E2 Purif.	0,062
HBKG	0,212	HDKG	0,113				
ch2E2 Purif.	0,044	ch2E2 Purif.	0,062				
Anticuerpos humanizados							
Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)		
ch2C4	0,057	ch2C4	0,079	ch2C4 T1	0,075		
HFAK	0,106	HAKA	0,085	HA2KA	NA		
HFKB	0,099	HAKF	0,078	HA2KB	124,30		
HFKC	0,063	HBKA	0,055	HB2KA	NA		
HFKD	0,058	HBKF	0,066	HB2KB	0,051		
HFKE	0,104	HA2KF	8,719	ch2C4	0,069		
HFKF	0,118	HB2KF	0,063	HA2KC	0,488		
HFKG	0,355	HEKA	0,068	HA2KD	NA		
		HEKB	0,063	HA2KE	NA		
		HEKC	0,069	HA2KF	NA		
		HEKD	0,059	HA2KG	NA		
		HEKE	0,057	HB2KC	0,101		
		HEKF	0,064	HB2KD	0,075		
		HEKF T2	0,064	HB2KE	0,087		
		mo2C4	0,115	HB2KF	0,089		
				HB2KG	0,227		
CDR variantes de anticuerpos humanizados							
Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)		
ch2C4	0,052	ch2C4	0,208	ch2C4	0,057		
RHE Y-V KA	0,088	RHE S-GKA	50,620	HAKFmut	0,086		
RHE Y-V KB	0,306	RHE S-GKB	626,900	HBKFmut	0,048		
RHE Y-V KC	0,215	RHE S-GKC	173,300	HCKFmut	0,078		
RHE Y-V KD	0,283	RHE S-GKD	8,647	HDKFmut	0,056		
RHE Y-V KE	0,070	RHE S-GKE	NA	HEKFmut	0,072		
RHE Y-V KF	0,091	RHE S-GKF	3,279	HFKFmut	0,057		
RHE Y-V KG	8,808	RHE S-GKG	33,540	HFKFmut	0,062		
RHE E-D KA	0,388	RHE Triple-KA	18,640				
RHE E-D KB	0,289	RHE Triple-KB	NA				
RHE E-D KC	0,516	RHE Triple-KC	NA				
RHE E-D KD	0,316	RHE Triple-KD	13,200				
RHE E-D KE	0,364	RHE Triple-KE	34,060				
RHE E-D KF	0,445	RHE Triple-KF	NA				
RHE E-D KG	NA	RHE Triple-KG	NA				

(continuación)

CDR variantes de anticuerpos humanizados							
Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)	Anticuerpo	CE50 (nM)		
ch2C4	0,075	ch2C4	0,075	ch2C4	0,175		
HEKA	0,054	HA2KA	NA	RHE S-G KFmut	207,100		
HEKE	0,042	HA2KB	124,300	RHE Triple KFmut	NA		
HEKF	0,074	HA2KFmut	31,610	HEKF	0,052		
RHE Y-V KFmut	0,398	HB2KA	0,051	HEKA	0,064		
RHE E-D KFmut	1,399	HB2KB	0,069				
		HB2KFmut	0,080				

Nota: Cada columna representa un experimento; NA indica no disponible.

Termoestabilidad de los anticuerpos candidatos humanizados a altas temperaturas

Se comparó la termoestabilidad de los anticuerpos humanizados. Los anticuerpos se sometieron a temperaturas elevadas, comprendidas de -20 a 85 °C, durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente y se evaluaron mediante ensayo ELISA a una concentración CE80 de cada candidato. Los principales anticuerpos candidatos parecieron ser estables (Fig. 4). Los anticuerpos HEKA/KF con CDRL3 (es decir, CDR3 de la cadena ligera) mutados fueron completamente inactivos a 68 °C, mientras que el quimérico era inactivo a 70 °C, a cuya temperatura, los principales candidatos HEKA y HEKF seguían un 25-50 % activos, mostrando solamente inactividad completa a 75 °C.

Determinación de la Tm de los anticuerpos candidatos humanizados

Para determinar la temperatura de fusión de los principales anticuerpos, los quiméricos, HEKA, HEKF y los mismos candidatos humanizados con la mutación CDRL3 (es decir, CDR3 de la cadena ligera) se purificaron en 2 pasos mediante cromatografía de afinidad, y filtración en gel, y se analizaron en un ensayo de desplazamiento térmico. Los anticuerpos se incubaron con dos concentraciones diferentes de colorante fluorescente (Sypro Orange) durante 71 ciclos con aumentos de 1 °C por ciclo en un termociclador qPCR. Tm se define como la temperatura del 50 % de la fluorescencia máxima. La Tm de los anticuerpos quiméricos y de los cinco anticuerpos humanizados confirmó los resultados obtenidos en el ensayo de termoestabilidad: los anticuerpos más estables fueron HEKA y HEKF que tenían una Tm mayor que los otros anticuerpos humanizados probados. HEKA tuvo una Tm mayor que la del anticuerpo quimérico (Fig. 5 y Tabla 7).

Tabla 7. Tm de los anticuerpos quiméricos y humanizados

Anticuerpo	TM
chVHVK 2 uM	71 °C
chVHVK 1 uM	71 °C
HEKA 2 uM	72 °C
HEKA 1 uM	72 °C
HEKF 2 uM	70 °C
HEKF 1 uM	70 °C
HEKAmut 2 uM	68 °C
HEKAmut 1 uM	68 °C
HEKFmut 2 uM	67 °C
HEKFmut 1 uM	68 °C

Afinidad y avidéz de los anticuerpos candidatos humanizados

La determinación de la avidéz del anticuerpo se llevó a cabo usando análisis SPR usando un equipo Biacore T200. La unión de ECD de la proteína Siglec-8 humana a anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados dirigidos contra Siglec-8 se midió en un equipo Biacore T100. Los anticuerpos de captura (anticuerpo de cabra contra Fc humano y anticuerpo de cabra contra Fc de ratón de Jackson Immunoresearch) se inmovilizaron en una oblea CM5 según el protocolo del fabricante (Biacore, GE). Las celdas de flujo 1, 2 y 3 se inmovilizaron con el anticuerpo dirigido contra la proteína humana, y la celda de flujo 4 con anticuerpos dirigidos contra la proteína de ratón. El ensayo se realizó a 25 °C, a un caudal de 30 µl/min. El tampón de ensayo fue Tris-HCl 20 mM pH 8,3, cloruro de sodio 150 mM, Polisorbato

20 al 0,05 %, glicerol al 10 %, BSA al 0,1 %, fabricados en agua ultrapura. Siglec-8 dimérica (las impurezas de Siglec-8 monomérica y oligomérica se eliminaron mediante cromatografía de exclusión molecular) se diluyó en tampón de ensayo de 15 nM a 1,88 pM con diluciones 2x. Los anticuerpos se capturaron a un cambio de aproximadamente 120 UR. Se realizaron inyecciones de alto rendimiento de 6 minutos, seguido por disociaciones de 120 minutos. Las células de flujo se regeneraron con glicina 50 mM, pH 1,5. Los resultados se refirieron a un blanco doble contra una célula de referencia vacía y múltiples inyecciones de tampón de ensayo, y se analizaron con parámetros de ajuste global 1:1.

La avidéz de los anticuerpos 2E2 murino y 2E2 quimérico se determinó en valores de 28 pM y 16 pM, respectivamente (Tabla 8). La avidéz de los anticuerpos humanizados tuvo valores de 17 pM para HEKA y 21 pM para HEKF lo que indicó que la humanización había retenido y potenciado correctamente la actividad de unión.

Tabla 8. Determinación de la avidéz de anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados

Anticuerpo	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (pM)
2E2 de ratón	5,56E+05	1,54E-05	28
2E2 quimérico	8,51E+05	1,32E-05	16
HEKA	6,38E+05	1,11E-05	17
HEKF	6,78E+05	1,40E-05	21

La determinación de la afinidad de los anticuerpos también se llevó a cabo mediante interferometría de biocapa (ForteBio). La unión de fragmentos Fab de ratón, quiméricos y humanizados dirigidos contra Siglec-8 de la proteína Siglec-8 humana se midió en un ForteBio Octet Red 384. El ensayo se realizó a 25 °C, a RPM de 1000 en tampón de ensayo. El tampón HBS con 1x de tampón ForteBio Kinetics se preparó a partir de soluciones madre (Biacore BR-10670, ForteBio 18-132 respectivamente) en agua de alta pureza. Los fragmentos Fab (los anticuerpos se digirieron con papaína inmovilizada Thermo-Pierce según las especificaciones del fabricante) se diluyeron en tampón de ensayo de 50 nM a 1.56 nM con diluciones 2x. La proteína Siglec-8-Fc marcada se inmovilizó sobre sensores de captura de la proteína humana a 100 nM en tampón de ensayo durante 3 min hasta un cambio de nm de aproximadamente 1,2. Se realizaron asociaciones de dos minutos, seguido por disociaciones de 10 minutos. Los resultados se compararon con un blanco con un sensor de referencia AHC vacío, y se analizaron mediante el programa informático de análisis ForteBio con parámetros de ajuste global 1:1.

La afinidad de los fragmentos Fab de 2E2 murino y 2E2 quimérico se determinó en valores de 536 pM y 585 pM, respectivamente (Tabla 9). Las afinidades de los anticuerpos humanizados fueron 464 pM para HEKA y 592 pM para HEKF, lo que indica que la humanización retuvo correctamente la afinidades de unión por estos dos anticuerpos humanizados. HEKA tuvo una mayor afinidad monovalente por Siglec-8 que 2E2 de ratón y quimérico en este ensayo. Las afinidades de los anticuerpos humanizados variantes, HEKAmut y HEKFmut, también estuvieron comprendidas en el intervalo picomolar, con valores de KD de 902 pM y 1160 pM, respectivamente.

Tabla 9. Determinación de la afinidad de anticuerpos de ratón, quiméricos y humanizados

Anticuerpo	kon (1/Ms)	kdis (1/s)	KD (pM)
2E2 de ratón	1,14E+06	6,12E-04	536
2E2 quimérico	9,51E+05	5,56E-04	585
HEKA	1,04E+06	4,82E-04	464
HEKF	9,20E+05	5,45E-04	592
HEKAmut	7,26E+05	6,55E-04	902
HEKFmut	4,45E+05	5,16E-04	1160

Solubilidad de los anticuerpos candidatos humanizados

Los anticuerpos quiméricos y candidatos purificados se concentraron secuencialmente usando dispositivos de filtro de centrifuga (Amicon 3OK 4 ml, 4000 g 5 min -primera concentración; Amicon Ultra 0,5 ml 3K, 14000 g -concentraciones sucesivas) y la concentración se midió en cada etapa. Todas las muestras se concentraron en total por un factor de hasta 21-24 sin precipitación y se analizaron mediante ELISA, que mostró que ninguno había perdido potencia de unión a Siglec-8. Los anticuerpos no mostraron tendencia la precipitación a concentraciones de hasta al menos 25 mg/ml. De manera específica, la solubilidad de ch2E2 fue de al menos 18 mg/ml, para HEKA fue de al menos 25 mg/ml, para HEKF fue de al menos 8 mg/ml, para HEKAmut de al menos 29 mg/ml, y para HEKFmut de al menos 17 mg/ml.

Agregación de anticuerpos candidatos humanizados

Las muestras se filtraron antes de realizar el análisis para eliminar cualquier precipitación de sales o proteínas, y las concentraciones se volvieron a determinar. A continuación se inyectaron a 0,4 ml/min en una columna de exclusión molecular de un sistema HPLC y se analizaron mediante dispersión de luz multiángulo para determinar las masas

molares absolutas y comprobar la agregación. Ninguna de las variantes mostró signos de agregación con un peso molecular promedio comprendido en 134,9-138,2 kDa, que era el intervalo esperado de un monómero de IgG en este análisis (Tabla 10).

- 5 Todas las muestras eran monodispersas ($M_w/M_n < 1,05$). Sin embargo, los gráficos de análisis de la distribución mostraron la presencia de variantes de glicosilación (ch2C4, HEKA y HEKFMut). Los gráficos de análisis de la distribución mostraron también la presencia de una especie ~105-120 kDa en todas las muestras, que podría haber sido un anticuerpo disgregado o una variante de glicosilación baja. Las recuperaciones de masa fueron entre 82,9-102,8 % (masa calculada respecto de la masa inyectada), lo que indica una buena recuperación de proteínas y que las muestras no parecen adherirse a la columna ni contener agregados insolubles, que podrían haber quedado retenidos en la columna de protección. En su conjunto, los datos indicaron que no se produjo una agregación significativa de ninguno de las muestras de anticuerpos anti-Siglec-8 analizadas (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de agregación de anticuerpos quiméricos y humanizados variantes

	MW (kDa)	Incertidumbre	Polidispersidad (Mw/Mn)	Incertidumbre	Masa calculada (µg)	Fración de masa (%)	Recuperación de masa (%)
ch2C4	138,7	0,80 %	1,01	1,10 %	11,02	100	96,6
ch2C4	134,6	0,80 %	1,017	1,10 %	10,86	100	95,2
Promedio	136,6		1,013		10,94	100	95,9
% desviación estándar	2,1		0,445		0,11	0	1
HEKA	134	0,90 %	1,03	1,30 %	15	100	102,8
HEKA	135,9	0,90 %	1,01	1,30 %	14,4	100	98,6
Promedio	134,9		1,02		14,7	100	100,7
% desviación estándar	1		0,014		0,43	0	2,9
HEKA Mut	135,4	0,80 %	1,013	1,10 %	13,61	100	98,8
HEKA Mut	137,3	0,90 %	1,011	1,30 %	13,68	100	99,3
Promedio	136,3		1,012		13,65	100	99
% desviación estándar	1,3		0,001		0,05	0	0,4
HEKF	291	13,90 %	1,742	14,40 %	4,83	100	88,1
HEKF	138,2	0,80 %	1,01	1,10 %	4,54	100	82,9
Promedio	214,6		1,376		4,69	100	85,5
% desviación estándar	50,3		37,622		4,31	0	4,3

- 15 Estabilidad a la congelación/descongelación de los anticuerpos candidatos humanizados
- El anticuerpo quimérico ch2C4 purificado, los anticuerpos humanizados HEKA y HEKF, y las variantes de anticuerpos humanizados HEKAmut y HEKFMut se sometieron a -20 °C durante 60 minutos, se descongelaron a temperatura ambiente y se utilizaron en un ensayo ELISA a la concentración CE80 de cada candidato. HEKA mostró la mayor estabilidad en este ensayo (Fig. 6).

Actividad ADCC de los anticuerpos no fucosilados

25 *Materiales*

Tampón de Lisis RBC (10X Tampón de lisis RBC): Diluir a 1X según las instrucciones del fabricante (eBioscience, 00-4300-54).

- 30 PBS: DPBS sin Ca^{2+}/Mg^{2+} (Hyclone, SH30028.02).

RPML completo: RPML-1640 esterilizado por filtración (Invitrogen) con FBS al 10 %.

Placa de 96 pocillos con fondo en U (Falcon, 353077).

Ensayo LDH: Ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96 (Promega, G1780)

- 5 Tampón FIX: Paraformaldehído al 1 - 4 % en PBS. Preparar a partir de paraformaldehído al 16 % (calidad EM, exento de metanol) por dilución en PBS (Electron Microscopy Diatom, 50-980-488).

Métodos

- 10 Para analizar la actividad ADCC y apoptótica de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 sobre los eosinófilos, leucocitos de sangre periférica (PBL) recientes se incubaron con los anticuerpos 2E2 quiméricos y de ratón. El anticuerpo 2E2 IgG1 con bajo contenido de fucosa mostró la actividad destructora de eosinófilos más potente y tuvo una potencia significativamente más elevada que el 2E2 IgG1 quimérico fucosilado, lo que es consistente con una mayor actividad ADCC de la forma con bajo contenido de fucosa del anticuerpo (Fig. 7).
- 15 Para evaluar la actividad del anticuerpo dirigido contra Siglec-8 en los leucocitos de sangre periférica total, los PBL se obtuvieron por métodos convencionales a partir de sangre de donante recogida menos de 24 horas antes de la recogida y suspendidos en medio RPMI completo. Las células se contaron y se ajustaron a 10×10^6 /ml en medio RPMI completo y se sembraron a 100 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U estéril. El anticuerpo dirigido contra Siglec-8 se agregó a una concentración comprendida entre 0,0001 ng/ml y 10 μ g/ml. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 1 minuto y se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 % durante > 4 horas.
- 20 Las poblaciones de células se evaluaron mediante citometría de flujo para evaluar el agotamiento de eosinófilos y basófilos, por ejemplo, usando los reactivos mostrados en la Tabla 11 y se evaluaron mediante citometría de flujo. La eliminación de células granulares positivas para CCR3 y negativas para CD 16 (dispersión lateral alta) se puede usar para detectar el agotamiento de los eosinófilos. El recuento de basófilos se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis de las células positivas para CCR3 con dispersión lateral baja.
- 25

Tabla 11. Reactivos

Diana	Formato	Clon	Especie diana	Hospedador	Isotipo	Proveedor	Número de catálogo
7AAD	7AAD	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559925
Anexina V	PE	N/A	N/A	N/A	N/A	BD	559763
CD117	APC	A3C6E2	Ser humano	Ratón	IgG ₁	Miltenyi	130-091-733
CD16	FITC	3G8	Ser humano	Ratón	IgG ₁	BD	555406
CD193 (CCR3)	Alexa Fluor® 647	5E8	Ser humano	Ratón	IgG _{2b}	BD	558208
CDw125 (IL-5R α)	PE	A14	Ser humano	Ratón	IgG ₁	BD	555902
PARP escindida	Alexa Fluor® 647	F21-852	Ser humano	Ratón	IgG ₁	BD	558710
FC ϵ R1 α	FITC	AER-37 CRA1	Ser humano	Ratón	IgG _{2b}	Miltenyi	130-095-978
Isotipo IgG ₁	PE	MOPC-21	N/A	Ratón	IgG ₁	BD	555749
Isotipo IgG _{2b}	FITC	27-35	N/A	Ratón	IgG _{2b}	BD	555742
Isotipo IgG _{2b}	APC	eBMG2b	N/A	Ratón	IgG _{2b}	eBioscience	17-4732

- 30 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 para inducir la apoptosis en eosinófilos purificados, se usó la capa leucocitaria reciente recogida en menos de 24 horas de una muestra de sangre o hematoproducto equivalente. La purificación de los eosinófilos se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Eosinophil Isolation Kit, 130-092-010). Los eosinófilos purificados se resuspendieron a 1×10^6 /ml en medio RPMI completo y se cultivaron en presencia o ausencia de IL-5 (a una concentración de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml) durante la noche. Al día siguiente, los eosinófilos cultivados se recogieron mediante lavado repetido de la placa o matraz. Las células se centrifugaron a 200 - 400 g durante menos de 10 minutos y se resuspendieron a 1×10^6 /ml en medio RPMI completo. Los eosinófilos sembraron a 100 μ l/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U estéril. 100 μ l de 2X reactivos preparados en medio RPMI completo se añadieron a cada pocillo, y las diluciones se prepararon como se ha descrito anteriormente. Las placas se centrifugaron a 200 g durante 1 minuto y se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 % durante \geq 4 horas. Las tinción con Anexina V se realizó según las instrucciones del fabricante, y las células apoptóticas y necróticas se analizaron mediante citometría de flujo.
- 35
- 40

Para evaluar la actividad ADCC y apoptótica de los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 en mastocitos aislados, se aislaron mastocitos humanos a partir de tejidos humanos de acuerdo con protocolos publicados (Guhl et al., *Biosci.*

Biotechnol. Biochem., 2011, 75:382-384; Kulka et al., en *Current Protocols in Immunology*, 2001, (John Wiley & Sons, Inc.) o se diferenciaron a partir de hemocitoblastos humanos, por ejemplo, como se describe en Yokoi et al., *J Allergy Clin Immunol.*, 2008, 121:499-505. Los mastocitos purificados se resuspendieron en 1×10^6 /ml en medio RPMI completo en una placa de 96 pocillos con fondo en U estéril y se incubó en presencia o ausencia de los anticuerpos anti-Siglec-8 durante 30 minutos a concentraciones comprendidas entre 0,0001 ng/ml y 10 µg/ml. Las muestras se incubaron de 4 a 16 horas más con o sin linfocitos citotóxicos naturales (NK) o PBL reciente para inducir ADCC. La destrucción celular por apoptosis o ADCC se analizó mediante citometría de flujo usando anticuerpos conjugados fluorescentes para detectar los mastocitos (CD117 y FcεR1) y anexina V y 7AAD para discriminar entre células muertas o moribundas. La tinción con Anexina V y 7AAD se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Evaluación de la actividad de agotamiento de eosinófilos por los anticuerpos humanizados *in vitro*

Se evaluó la capacidad de los anticuerpos humanizados para inducir el agotamiento de los eosinófilos mediada por Siglec-8 en sangre humana normal *in vitro* en comparación con el anticuerpo de 2E2 murino.

Leucocitos de sangre periférica (PBL) procedente de sangre de donante humano recogida menos de 24 horas después de la extracción se suspendieron en medio RPMI completo [(medio RPMI-1640 (Invitrogen, n.º de catálogo A10491-01) suplementado con suero de feto de bovino al 10 %)]. Las células se ajustaron a 10^7 por ml en medio RPMI completo suplementado con 50 ng/ml de IL-5 recombinante humano (R&D Systems, número de catálogo 205-IL-025) y se sembraron a 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en U estéril. Se añadieron los anticuerpos anti-Siglec-8 a concentraciones de PLGA que variaban entre 0,1 pg/ml y 10 µg/ml (es decir, 1 pg/ml, 10 pg/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, y 10 µg/ml) para determinar la respuesta a la dosis y la concentración que proporciona el agotamiento máximo del 50 % de los eosinófilos (CE₅₀). Las placas se centrifugaron a 200 g durante 1 minuto y se incubaron en una incubadora humidificada a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 16 horas. Incubación de PBL con anticuerpos anti-Siglec-8 durante 16 horas en presencia de eosinófilos sensibilizados con IL-5 para determinar la apoptosis mediada por Siglec-8. Las poblaciones de células se evaluaron mediante citometría de flujo para evaluar el agotamiento de eosinófilos. El agotamiento de eosinófilos se detectó por la eliminación de las células granulares positivas para CCR3 (dispersión lateral alta).

Cada uno de los anticuerpos humanizados sometidos a ensayo, con la excepción del anticuerpo IgG1 HEKAmut, mostraron una potencia equivalente o mayor (es decir, un valor CE₅₀ menor) en comparación con el anticuerpo de 2E2 de ratón para el agotamiento de eosinófilos humanos (Tabla 12). La potencia del anticuerpo para el agotamiento de eosinófilos humanos no dependía del isotipo, ya que el anticuerpo IgG1 HEKA y el anticuerpo IgG4 HEKA mostraron una potencia similar.

Tabla 12. Potencia de los anticuerpos anti-Siglec-8 humanizados para el agotamiento de eosinófilos *in vitro*

Anticuerpo	Isotipo	CE50 (ng/ml) promedio para el agotamiento de eosinófilos
2E2	IgG1	6,8
HEKA	IgG1	4,3
HEKA	IgG4	3,9
HEKAmut	IgG1	43,3
HEKF	IgG1	6,7
HEKFmut	IgG1	6,9

La CE50 promedio indica las concentraciones semimáximas del anticuerpo necesarias para el agotamiento de los eosinófilos en 2 ensayos independientes.

Los anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 con un isotipo activo son capaces de inducir la destrucción mediada por ADCC de los mastocitos humanos *in vitro* e *in vivo*.

Para generar un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado con una potente actividad ADCC mediada por el receptor de Fc, el anticuerpo IgG1 HEKA se expresó en una línea celular CHO deficiente en farnesil transferasa 8 (Lonza, células CHOK1SV Potelligent) para generar un anticuerpo con carbohidratos que carecen de α1,6 fucosa (es decir, anticuerpo no fucosilado). Un anticuerpo monoclonal de murino dirigido contra Siglec-8 con un isotipo IgG2a de murino (es decir, anticuerpo 1C3) que reconoce una región extracelular de Siglec-8 diferente del anticuerpo IgG1 HEKA se generó como se describe en el Ejemplo 3. El anticuerpo 1H10 quimérico contiene las regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón 1H10 y las regiones constantes kappa de IgG1 humana. El anticuerpo 1H10 quimérico se expresó a partir de la línea celular 293TS humana en presencia de kifunesina 10 µM para generar anticuerpos con bajo contenido de fucosa y se purificó por cromatografía de afinidad de Proteína A.

La capacidad de la IgG1 HEKA no fucosilada y del anticuerpo 1H10 de bajo contenido de fucosa para inducir la actividad ADCC mediada por linfocitos NK contra mastocitos humanos se evaluó *in vitro*. Los mastocitos humanos se aislaron por lavado de la cavidad peritoneal de ratones NSGS inmunodeficientes inyectados con hemocitoblastos

humanos. Los mastocitos se incubaron durante 48 horas con 10 µg/ml de anticuerpo de IgG1 HEKA no fucosilada, anticuerpo quimérico 1H10 de bajo contenido de fucosa, anticuerpo de IgG4 HEKA o anticuerpo IgG1 humano control de isotipo, y con células efectoras NK CD56⁺CD16⁺ humanas purificadas en una relación de célula efectora a diana (E:T) de 10,75:1. La actividad ADCC se determinó mediante liberación de LDH usando un kit CytoTox 96 Cytotoxicity Assay (Promega, número de catálogo G1780). El anticuerpo de IgG1 HEKA no fucosilada y el anticuerpo quimérico 1H10 de bajo contenido de fucosa indujeron una marcada destrucción de mastocitos humanos mediada por ADCC después de 48 horas (Fig. 8A). La liberación de LDH inducida por el anticuerpo dirigido contra Siglec-8 no fucosilado o de bajo contenido de fucosa fue un 38-53 % de la liberación máxima de LDH inducida usando la solución de lisis (Promega, n.º de catálogo G1821).

La capacidad de los anticuerpos dirigidos a Siglec-8 para agotar los mastocitos positivos para Siglec-8 *in vivo* se evaluó en un modelo de ratón transgénico en el que la Siglec-8 humana se expresa selectivamente sobre la superficie de los mastocitos, eosinófilos y basófilos. Los ratones se trataron dos veces por inyección intraperitoneal con 100 µg del anticuerpo de IgG4 HEKA, anticuerpo de IgG1 HEKA no fucosilada humanizado, anticuerpo de 1C3 murino (isotipo IgG2a murino) o anticuerpo de IgG1 humano control de isotipo. Las dos inyecciones intraperitoneales se administraron con 48 horas de separación, y los mastocitos peritoneales se aislaron por lavado del peritoneo 48 horas después de la segunda inyección. La administración del anticuerpo de IgG1 HEKA no fucosilada y del anticuerpo de 1C3 murino llevó a un agotamiento significativo de los mastocitos peritoneales. En cambio, el anticuerpo de IgG4 HEKA no mostró un agotamiento de mastocitos significativo, lo que indica que se necesita el isotipo activo para el agotamiento *in vivo* de los mastocitos (Fig. 8B). Estos resultados demuestran que dos anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 diferentes con un isotipo activo, el isotipo IgG2a de murino o el isotipo IgG1 humano no fucosilado, dirigido contra regiones diferentes del dominio extracelular de Siglec-8, puede agotar los mastocitos positivos para Siglec-8 *in vivo*.

Estos resultados eran inesperados, ya que se había descrito que Siglec-8 se internalizaba rápidamente y que por tanto no era adecuada para inducir actividad ADCC. Véase O'Reilly *et al.*, *Trends Pharmacol Sci.*, 2009, 30(5):240-248.

El anticuerpo dirigido contra Siglec-8 humanizado inhibe una reacción de anafilaxia cutánea pasiva inducida por IgE mediada por mastocitos humanos *in vivo*

Se han descrito ratones inmunodeficientes capaces de generar abundantes mastocitos humanos tras injerto con hemocitoblastos humanos (HSC) (Tanaka *et al.*, *J Immunol.*, 2012, 188(12):6145-55). La cepa de ratón denominada como NSGS (The Jackson Laboratory) es un derivado del ratón diabético no obeso/inmunodeficiencia grave combinada (NOD SCID) con una delección del gen de la cadena gamma del receptor de IL-2 (ratón NSG). Los ratones NSGS son adicionalmente transgénicos para 3 citoquinas humanas (factor citoblástico [SCF], IL-3, y GM-CSF) para facilitar el injerto con hemocitoblastos humanos. Tras injerto de los ratones NSGS, las células CD34⁺ humanas generan eosinófilos humanos y potencian el número de mastocitos humanos. Ambos tipos de células en ratones NSGS injertados expresan Siglec-8 en niveles comparables a los niveles de los correspondientes tipos celulares aislados de sangre periférica y tejidos humanos. Así, estos ratones proporcionan un atractivo modelo para evaluar la actividad de anticuerpos anti-Siglec-8 en células humanas *in vivo*.

Para evaluar el efecto de los anticuerpos anti-Siglec-8 sobre la actividad de los mastocitos *in vivo*, se estableció un modelo de inflamación de la oreja mediada por IgE en ratones NSGS humanizados. En este modelo, una anafilaxia cutánea pasiva (PCA), una reacción de hipersensibilidad de Tipo I, se indujo por inyección de un anticuerpo monoclonal específico contra el hapteno de IgE (IgE anti-NP) en una oreja 24 horas antes de la inyección sistémica de albúmina de suero bovino conjugada con el hapteno (NP-BSA). La IgE anti-NP quimérica con una región constante épsilon humana se usó para garantizar que se generaban respuestas específicas de mastocitos humanos al hapteno, y las respuestas edematosas iniciales y tardías se midieron por los cambios que se producen en el espesor de la oreja.

Los ratones NSGS se injertaron con HSC CD34⁺ humanas de ocho a doce semanas antes del ensayo. El anticuerpo monoclonal quimérico IgE anti-NP con una región constante humana se inyectó por vía intradérmica a un ratón a una dosis de 100 ng en la oreja derecha para sensibilizar los mastocitos cutáneos humanos y no de ratón, y se inyectó PBS por vía intradérmica en la oreja izquierda. Veinticuatro horas después, se indujo PCA mediante inyección intravenosa de 0,5 mg de NP-BSA. Los ratones recibieron dosis mediante inyección intravenosa de 0,1 mg de anticuerpo dirigido contra Siglec-8 (es decir, anticuerpo de IgG4 HEKA) o anticuerpo control de isotipo de IgG4 24 horas antes de la sensibilización o 2 horas después de la sensibilización con IgE anti-NP. El espesor de la oreja se midió en puntos temporales de hasta cuatro horas después de la inducción y a las 24 horas de la inducción para determinar la respuesta de inflamación de la oreja inicial y tardía, respectivamente.

El anticuerpo de IgG4 HEKA previno o inhibió las reacciones alergias cutáneas tanto iniciales como tardías en este modelo de PCA *in vivo* (Fig. 9). En este modelo, la reacción en fase inicial es dependiente de la desgranulación de los mastocitos y de la liberación de la histamina, mientras que la reacción en fase tardía es dependiente de la secreción de mediadores de nueva síntesis por los mastocitos, incluyendo citoquinas, así como la infiltración de eosinófilos y basófilos. El anticuerpo de IgG4 HEKA también previno o inhibió la respuesta de PCA en ratones NSGS humanizados cuando recibieron dosis 24 horas antes de la sensibilización y 2 horas después de la sensibilización con IgE anti-NP (Fig. 9). No se observaron efectos adversos del tratamiento con anticuerpos durante el transcurso de estos experimentos.

Ejemplo 3: Generación y caracterización de anticuerpos contra Siglec-8 murino.

5 La región extracelular de Siglec-8 está compuesta por tres dominios de tipo inmunoglobulina: un único dominio del conjunto V en el extremo N (Dominio 1) que se une a ligandos, seguido por dos dominios del conjunto C (Dominios 2 y 3). El anticuerpo 1C3 es un anticuerpo monoclonal de murino con una cadena pesada de IgG2a y una cadena ligera kappa sensibilizado contra un dominio extracelular recombinante de Siglec-8 humana (SEQ ID NO: 74). Los anticuerpos monoclonales 1H10 y 4F11 son anticuerpos de la cadena pesada de IgG1 y de la cadena ligera kappa de murino sensibilizados contra un dominio extracelular recombinante de Siglec-8 humana (SEQ ID NO: 74). Véase la
10 Tabla 13. Estos anticuerpos se identificaron a partir de un cribado de hibridomas que buscaba anticuerpos que se unieran a las secuencias de Siglec-8 recombinante de origen humano (SEQ ID NO: 74) y de primates no humanos (SEQ ID NO: 118).

Tabla 13. Secuencias de aminoácidos de HVR de anticuerpos 1C3, 1H10, y 4F11 de murino

Anticuerpo	Cadena	HVR1	HVR2	HVR3
1C3	Cadena pesada	SYAMS	IISGGGSYTYYSDSVKG	HETAQAAWFAY
		SEQ ID NO:88	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:94
1H10	Cadena pesada	DYYMY	RIAPEDGDTEYAPKFQG	EGNYYGSSILDY
		SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:95
4F11	Cadena pesada	SSWMN	QIYPGDDYTNNGKFKG	LGPYGPFAD
		SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:96
1C3	Cadena ligera	SASSSVSYMH	DTSKLAY	QQWSSNPPT
		SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:100	SEQ ID NO:103
1H10	Cadena ligera	RASQDITNYLN	FTSRLHS	QQGNTLPWT
		SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:104
4F11	Cadena ligera	SASSSVSYMY	DTSSLAS	QQWNSDPYT
		SEQ ID NO:99	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:105

15 Para identificar la región que comprende el epítipo de los anticuerpos anti-Siglec-8, las proteínas de fusión que expresaban cada uno de los dominios extracelulares de Siglec-8 fusionados a Ig-Fc humana se expresaron y purificaron en células CHO. Las proteínas de fusión que contenían el Dominio 1 humano (SEQ ID NO: 115), los Dominios 1 y 2 (SEQ ID NO: 116); o los Dominios 1, 2, y 3 (SEQ ID NO: 117) se usaron en ensayos ELISA para
20 determinar la unión del anticuerpo. En algunos experimentos se evaluó la especificidad de los anticuerpos contra Siglec-8 humana en comparación con una proteína de fusión que contenía los Dominios extracelulares 1, 2, y 3 de Siglec-8 (SEQ ID NO: 118) del babuino (*Papio anubis*) (secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information XP 009193370.1).

25 Para los ensayos de unión con el anticuerpo, placas ELISA (MaxiSorp; Nunc) se revistieron durante la noche a 4 °C con la proteína de fusión a 0,2 µg/ml y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 2 % en PBS. Se añadieron los anticuerpos a 1 µg/ml y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante y las placas se incubaron durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios estaban dirigidos contra H+L HRP humano (Jackson
30 ImmunoResearch, n.º de catálogo 709-035-149) para los anticuerpos humanizados o bien contra H+L HRP de ratón (Jackson ImmunoResearch, n.º de catálogo 715-035-151) para anticuerpos de ratón. Las placas se revelaron con sustrato TMB (Sigma, n.º de catálogo T0440-1L).

35 El anticuerpo de 2E2 murino y el anticuerpo de IgG1 HEKA se unieron a la proteína de fusión del Dominio 1, lo que indica que el epítipo de estos dos anticuerpos se encuentra en el dominio de unión a ligando del extremo N (Tabla 14). En cambio, el anticuerpo de 1C3 murino se unió a la proteína de fusión del Dominio 1 y Dominio 2, pero no puso de manifiesto unión detectable a la proteína de fusión del Dominio 1, lo que indica que el epítipo de este anticuerpo se encuentra en el Dominio 2 (Tabla 14).

Tabla 14. Unión de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 a los epítomos de Siglec-8 humana

Anticuerpo	Dominio 1-Fc (SEQ ID NO: 115)	Dominio 1+2-Fc (SEQ ID NO: 116)	Dominio 1+2+3-Fc (SEQ ID NO: 117)	Dominio del epítomo
2E2	+	+	+	1
HEKA	+	+	+	1
1C3	-	+	+	2

Los anticuerpos 4F11 y 1H10 de murino se unieron a la Siglec-8 humana y la secuencia de la proteína Siglec-8 prevista a partir del babuino (*Papio anubis*) (secuencia de referencia del National Center for Biotechnology Information XP 009193370.1). En los cribados mediante ELISA de las proteínas de fusión y en las transferencias Western de los geles SDS-PAGE reducidos, 4F11 reconoció un epítomo lineal en el Dominio 1 de Siglec-8 humana y 1H10 reconoció un epítomo lineal que incluía secuencias del Dominio 3 de Siglec-8 humana. 1C3 no reconoció secuencias desnaturalizadas del Dominio 2 de Siglec-8 humana, lo que indica que reconoció un epítomo conformacional. Los anticuerpos 4F11 y 1H10 mostraron un agotamiento intenso de los eosinófilos procedentes de leucocitos de sangre periférica humana en presencia de IL-5 50 ng/ml, con una CE_{50} de 5,9 y 41 ng/ml, respectivamente (Tabla 15). El anticuerpo de 1C3 murino y el anticuerpo de 2E2 murino específicos de Siglec-8 humana no mostraron reactividad cruzada con Siglec-8 de babuino.

Tabla 15. Unión de anticuerpos dirigidos contra Siglec-8 a epítomos de Siglec-8 humana o de babuino y actividad de agotamiento de los anticuerpos contra eosinófilos humanos

Anticuerpo	Epítomo del dominio de Siglec-8 humana	Epítomo lineal (SDS-PAGE reducido)	Reactividad cruzada con el babuino (ELISA)	CE_{50} media (ng/ml) para la destrucción de eosinófilos (2 donantes)
4F11	1	+	+	5,9
1H10	3	+	+	41
1C3	2	-	-	7,7
2E2	1	+	-	6,9

La CE_{50} promedio indica las concentraciones semimáximas del anticuerpo necesarias para el agotamiento de los eosinófilos en 2 ensayos independientes.

La unión de los anticuerpos a eosinófilos humanos y de babuino se determinó mediante citometría de flujo. Las preparaciones de leucocitos de sangre periférica humana o de babuino se etiquetaron con cantidades de saturación de los anticuerpos monoclonales contra Siglec-8 2E2, 1C3, y 1H10 o el anticuerpo control de isotipo de IgG1 de ratón. Los anticuerpos contra Siglec-8 se visualizaron mediante un anticuerpo secundario contra IgG H+L de ratón marcado con AlexaFluor 647. Los eosinófilos se identificaron utilizando anticuerpos de primate que reaccionan en cruzado con CD49d y CD 16 junto con la dispersión de alta granularidad. El anticuerpo de 1H10 de murino se unió a eosinófilos de babuino y humano, mientras que los anticuerpos 2E2 y 1C3 de murino se unieron a los eosinófilos humanos pero no mostraron reactividad cruzada con eosinófilos de babuino (Fig. 10). Estos resultados fueron inesperados, ya que otros anticuerpos monoclonales contra Siglec-8 que se unían a Siglec-8 humana habían mostrado no reconocer la Siglec-8 de primate no humanos. Véase Hudson et al., *J. Clin. Immunol.*, 2011, 31(6):1045-53.

SECUENCIAS

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 de ratón

QVQLKESGPGGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTNY
NSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDDTALYYCARDGSSPYYYSM EYWGGQTSVT
VSS (SEQ ID NO:1)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHA

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWWSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EYWGGQTT
VTVSS (SEQ ID NO:2)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHB

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO:3)

5 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHC

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO:4)

10 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHD

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWLSVIWAGGSTN
YNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO:5)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHE

15 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
N YNSALMSRFTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
TVT VSS (SEQ ID NO:6)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHF

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRLTISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO:7)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHG

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVSVIWAGGSTN
YNSALMSRFSISKDNSKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGTT
VTVSS (SEQ ID NO:8)

25 Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHA2

QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGGSISIIYGAHWIRQPPGKGLEWIGVIWAGGSTN
YN SALMSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
LTVV SS (SEQ ID NO:9)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHB2

30 QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDGSSPYYYSMEYWGQGT
LTVV SS (SEQ ID NO:10)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHE S-G mutante

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMEYWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO:11)

5

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHE E-D

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM DYWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO:12)

10

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHE Y-V

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYSM EVWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO:13)

15

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 2E2 RHE triple

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVIWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYYGMDVWGQG
TTVTVSS (SEQ ID NO:14)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 de ratón

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO:15)

20

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:16)

25

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKB

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGVPARF
SGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:17)

30

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKC

EIILTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARFS
GSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:18)

35

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKD

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLWIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:19)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKE

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGVPAR
FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:20)

5

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:21)

10

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 2E2 RKG

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:22)

15

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena 2E2 RKA F-Y mutante

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:23)

20

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena 2E2 RKF F-Y mutante

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPYTFGPGTKLDIK (SEQ ID NO:24)

25

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de IgG1 HEKA y de la cadena pesada de IgG1 HEKF

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPYYSMEYWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:75)

30

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa HEKA

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:76)

30

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa HEKF

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWFQQKPGQAPRLLIYSTSNLASGIPARF
SGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSSYPFTFGPGTKLDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:77)

5

Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:78)

10

Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG4 (IgG4 contiene una mutación S228P)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRW
QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO:79)

15

Secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera kappa de Ig

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:80)

20

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de 2C4 y 2E2 de IgG1 de murino

QVQLKRAAGPGLVAPSQSLTCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKSQVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYYSMMEYWGQGTSV
TVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPA
VLES DLYTLSSSVTVPSPPRSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSS
VFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMA
KDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLVNQKSN
WEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKLSLHSPG (SEQ ID NO:81)

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de 2C4 de murino

EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYKPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:82)

5

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de 2E2 de murino

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYKPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK (SEQ ID NO:83)

10

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada quimérica de 2C4 y 2E2 de IgG1

QVQLKRRASGPGGLVAPSQSLITCTVSGFSLTIYGAHWVRQPPGKGLEWLGVIWAGGSTN
YNSALMSRLSISKDNSKSKVFLKINSLQTDALYYCARDGSSPYYSMEYWGQGTSV
TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSAFLYS
KLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:84)

15

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de 2C4 quimérica

EIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYKPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:85)

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera kappa de 2E2 quimérica

QIILTQSPAIMSASPGEKVSITCSATSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPVRF
SGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSSYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYKPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:86)

20

25

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de IgG4 HEKA (IgG4 contiene una mutación S228P)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFS¹SLTIYGAHWVRQAPGKGLEWVGVWAGGST
NYNSALMSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSPY²YYSMEYWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS³GVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG⁴TKTYTCNV⁵VDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEF
5 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL⁶SLG (SEQ ID NO:87)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 1C3 de ratón (los restos subrayados comprenden las CDR H1 y H2 según la numeración de Chothia)

10 EVQVVESGGDLVKS¹GGSLKLSAASG²FPFSSY³AMSWVRQTPDKRLEWVAI⁴SSGGSY⁵TY
YSDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHETAQA⁶AWFAYWGQGLV
TVSA (SEQ ID NO:106)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 1H10 de ratón (los restos subrayados comprenden las CDR H1 y H2 según la numeración de Chothia)

15 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASG¹FN²IKDY³MYWVKQRPEQGLEWIGRI⁴APEDGDT
EYAPKFQGKATVTADTSSNTAYLHLSL⁵TSEDTAVYYCTTEGNYYGSSILDYWGQGT
LTVSS (SEQ ID NO:107)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada de 4F11 de ratón (los restos subrayados comprenden las CDR H1 y H2 según la numeración de Chothia)

20 QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASG¹YAF²RSS³WMN⁴WVKQRPGKGLEWIGQI⁵YPGDDY
TNYNGKFKGKVTLTADRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARLGPYGP⁶FADWGQGLV
VSA (SEQ ID NO:108)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 1C3 de ratón

25 QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSY¹MHWYQ²QKSGTSPKRWIYDTSKLAYGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQ³QWSSNPPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:109)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 1H10 de ratón

30 DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDITNYLNWYQ¹KPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQ²QGNTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:110)

Secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera de 4F11 de ratón

QIVLTQSPAIVSASPGEKVTMTCSASSSVSY¹MYWYQ²QRPGSSPRLIYDTSSLASGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRIE³EDAANYCQ⁴QWNSDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:111)

Secuencia de aminoácidos del Dominio 1 de Siglec-8 humana

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTRP (SEQ ID NO:112)

5

Secuencia de aminoácidos del Dominio 2 de Siglec-8 humana

DILILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGTTPMISWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPQDH
GTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVS (SEQ ID NO:113)

10

Secuencia de aminoácidos del Dominio 3 de Siglec-8 humana

YPPWNLMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTL
CPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTTSRPVSQVTLA
AVGG (SEQ ID NO:114)

15

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión del Dominio 1 de Siglec-8 humana

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTRPIEGRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:115)

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de los Dominios 1 y 2 de Siglec-8 humana

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
PYQDAPVATNNDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTRPDILILGTLESGHSRNLTCVWPWACKQGTTPMI
SWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSIEGRSD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:116)

20

25

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de los Dominios 1, 2 y 3 de Siglec-8 humana

MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPQDGWTDSDPVHGYWFRAGDR
 PYQDAPVATNNPDREVQAETQGRFQLLGDIWSNDCSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGS
 MKWSYKSQLNYKTKQLSVFVTALTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVSPWACKQGTPPMI
 SWIGASVSSPGPTTARSSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTSTVRLDVSYPWN
 LTMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVNSNPPARLSWTRGSLTLCPSRSS
 NPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISLSLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGIE
 GRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:117)

5

Secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión de los Dominios 1, 2 y 3 de Siglec-8 de babuino

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPKDDWTYS DPVHGYWFRAGDR
 PYQEAPVATNNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
 MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLESGHPRNLTCVSPWACEQRMPPM
 ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWN
 LTVTTFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
 NPGLLELLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTLAAVGGIE
 GRSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ
 ID NO:118)

10

Secuencia de aminoácidos de los Dominios 1, 2 y 3 de Siglec-8 de babuino

MEGDRKYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSYPKDDWTYS DPVHGYWFRAGDR
 PYQEAPVATNNPDTEVQAETQGRFQLLGDRWSNDCSLSINDARKGDEGSYFFRLERGR
 MKWSYKSQLNYKAKQLSVFVTALTQRPDILIQGTLESGHPRNLTCVSPWACEQRMPPM
 ISWIGTSVSSLGPITARFSVLTLPKPKQDHGTSLTCQVTLPGTGVTTRTVQLDVSYPWN
 LTVTTFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTRGSLTLCPSQPW
 NPGLLELLRVHVKDEGEFTCQAENPRGSQHISLSLSLQNEGTGTARPVSEVTLAAVGG
 (SEQ ID NO:119)

15

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> BEBBINGTON, CHRISTOPHER ROBERT
 FALAHATI, RUSTOM
 SOUSA FERNANDES, CAROLINA RITA
 MATTHEWS, DAVID JOHN
 TOMASEVIC, NENAD
 WILLIAMS, JASON
 10 LEUNG, JOHN

<120> ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA SIGLEC-8 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

15 <130> 701712000140
 <150> US 61/913.891
 <151> 09/12/2013

20 <160> 124
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25 <210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

40 <400> 2

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ala	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ser	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met

ES 2 758 508 T3

	50					55						60				
	Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu
	65					70					75					80
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85					90					95	
	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln
				100					105					110		
	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
				115				120								

5 <210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 3

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

15 <210> 4
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 4

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

25

ES 2 758 508 T3

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Construcción sintética

 10 <400> 5

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

<210> 6
 15 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Construcción sintética

 <400> 6

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

25 <210> 7
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Construcción sintética

 <400> 7

ES 2 758 508 T3

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

5 <210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 8

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

15 <210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Ala His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met

ES 2 758 508 T3

	50					55						60				
	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65					70					75					80
	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
					85					90					95	
	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100						105					110		
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
			115					120								

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 10

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

<210> 11
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Construcción sintética

20

<400> 11

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

25

ES 2 758 508 T3

5 <210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 12

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

15 <210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

20 <400> 13

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

25 <210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 14

ES 2 758 508 T3

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

5 <210> 15
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 15

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

15 <210> 16
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 16

25 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

ES 2 758 508 T3

65					70					75				80	
Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Leu	Asp	Ile	Lys						
			100					105							

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

10

<400> 17

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

15

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 18

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

25

<210> 19
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 19

```

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

5 <210> 20
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 20

```

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

15 <210> 21
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

25 <400> 21

```

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

ES 2 758 508 T3

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105

5 <210> 22
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 22

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

15 <210> 23
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 23

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

25 <210> 24
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Construcción sintética

35 <400> 24

ES 2 758 508 T3

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

5 <210> 25
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 25
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

15 <210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

25 <210> 27
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30

35 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 28
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser
 20 25 30

ES 2 758 508 T3

<210> 29
 <211> 30
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr
 20 25 30
 10
 <210> 30
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 30
 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 1 5 10
 20
 <210> 31
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25
 <400> 31
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10
 30
 <210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 32
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
 1 5 10
 40
 <210> 33
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 33
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ser
 1 5 10
 50
 <210> 34
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 55
 <400> 34
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10
 <210> 35
 <211> 14

ES 2 758 508 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

5 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 36
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10

<400> 36

15 Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 37

25 Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys
1 5 10 15
Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 38
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30

<400> 38

35 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 39
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40

<400> 39

45 Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 40
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

50

<400> 40

50 Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

ES 2 758 508 T3

<210> 41
 <211> 32
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 41
 Arg Phe Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 10
 <210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 42
 Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 20
 <210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 43
 Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30
 30
 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 35
 <210> 45
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 45
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 40
 <210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

 <400> 46
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

ES 2 758 508 T3

<210> 47
 <211> 23
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 47
 Gln Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys
 20
 10
 <210> 48
 <211> 23
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

 <400> 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20
 20
 <210> 49
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 49
 Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20
 30
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 50
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 1 5 10 15
 40
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 51
 Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 50
 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 52

ES 2 758 508 T3

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Trp Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 53
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 55
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 55
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 56
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 57
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 58
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 758 508 T3

<400> 58

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 59

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

15

<210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 60

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 1 5 10

25

<210> 61
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 61

Ile Tyr Gly Ala His
 1 5

35

<210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
 1 5 10 15

40

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 63

Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr
 1 5 10

50

<210> 64
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 64

ES 2 758 508 T3

		Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His			
		1				5					10			
5	<210> 65													
	<211> 7													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 65													
10			Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser					
			1				5							
15	<210> 66													
	<211> 9													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 66													
20			Gln	Gln	Arg	Ser	Ser	Tyr	Pro	Phe	Thr			
			1				5							
25	<210> 67													
	<211> 12													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 67													
30			Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Glu	Tyr
			1				5					10		
35	<210> 68													
	<211> 12													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 68													
40			Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Asp	Tyr
			1				5					10		
45	<210> 69													
	<211> 12													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 69													
50			Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Glu	Val
			1				5					10		
55	<210> 70													
	<211> 12													
	<212> PRT													
	<213> Homo sapiens													
	<400> 70													
55			Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val
			1				5					10		
	<210> 71													
	<211> 9													
	<212> PRT													

ES 2 758 508 T3

<213> Homo sapiens

<400> 71

5 Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 72

<211> 474

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 72

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu
1 5 10 15
Cys Val His Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr
20 25 30
Asp Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro
35 40 45
Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln
50 55 60
Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn
65 70 75 80
Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser
85 90 95
Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser
100 105 110
Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu
115 120 125
Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His
130 135 140
Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr
145 150 155 160
Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro
165 170 175
Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp
180 185 190
His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val
195 200 205
Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn
210 215 220
Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Ala Thr Ala Ser Thr Ala Leu
225 230 235 240
Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu
245 250 255
Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg

15


```

                260                                265                                270
Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu
                275                                280                                285
Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg
                290                                295                                300
Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu
305                                310                                315
Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr Ser Arg Pro Val Ser Gln Val Thr Leu
                325                                330                                335
Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Phe
                340                                345                                350
Cys Ile Ile Phe Ile Ile Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg
                355                                360                                365
Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Met Glu Asp Ala Lys Ala Ile
                370                                375                                380
Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu Ser Trp Lys Asp Gly
385                                390                                395
Asn Pro Leu Lys Lys Pro Pro Pro Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly Glu
                405                                410                                415
Glu Gly Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Ser Phe His Lys Val Lys Pro
                420                                425                                430
Gln Asp Pro Gln Gly Gln Glu Ala Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Glu Ile
                435                                440                                445
Lys Ile His Lys Arg Glu Thr Ala Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Asn
                450                                455                                460
His Asn Pro Ser Ser Lys Glu Val Arg Gly
465                                470

```

<210> 73
 <211> 474
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

```

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu
 1                    5                    10                    15
Cys Val His Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr
                20                    25                    30
Asp Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro
                35                    40                    45
Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln
 50                    55                    60
Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn
65                    70                    75                    80
Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser
                85                    90                    95
Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser
                100                    105                    110
Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu
                115                    120                    125
Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His
                130                    135                    140
Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr
145                    150                    155                    160
Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro
                165                    170                    175
Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp
                180                    185                    190
His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val
                195                    200                    205
Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn
                210                    215                    220

```

10

ES 2 758 508 T3

Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Ala Thr Ala Ser Thr Ala Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu
 245 250 255
 Val Cys Ala Val Asn Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg
 260 265 270
 Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu
 275 280 285
 Glu Leu Pro Arg Val His Val Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg
 290 295 300
 Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr Ser Arg Pro Val Ser Gln Val Thr Leu
 325 330 335
 Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Phe
 340 345 350
 Cys Ile Ile Phe Ile Ile Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg
 355 360 365
 Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Met Glu Asp Ala Lys Ala Ile
 370 375 380
 Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu Ser Trp Lys Asp Gly
 385 390 395 400
 Asn Pro Leu Lys Lys Pro Pro Pro Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly Glu
 405 410 415
 Glu Gly Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Ser Phe His Lys Val Lys Pro
 420 425 430
 Gln Asp Pro Gln Gly Gln Glu Ala Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Glu Ile
 435 440 445
 Lys Ile His Lys Arg Glu Thr Ala Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Asn
 450 455 460
 His Asn Pro Ser Ser Lys Glu Val Arg Gly
 465 470

<210> 74
 <211> 573
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu
 1 5 10 15
 Cys Val His Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr
 20 25 30
 Asp Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro
 35 40 45
 Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln
 50 55 60
 Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn
 65 70 75 80
 Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser
 85 90 95
 Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser
 100 105 110
 Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu
 115 120 125
 Thr His Arg Pro Asp Ile Leu Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His
 130 135 140
 Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr
 145 150 155 160
 Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro
 165 170 175
 Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp

10

ES 2 758 508 T3

			20					25					30			
Gly	Ala	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Met	
	50					55					60					
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	Leu	
65					70					75					80	
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
				85					90					95		
Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	
			100					105						110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	
		115					120					125				
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	
130						135					140					
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	
				165					170					175		
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	
			180					185						190		
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	
		195					200					205				
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	
	210					215					220					
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	
				245					250					255		
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	
			260					265						270		
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
		275					280					285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290					295					300					
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
				325					330					335		
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
			340					345						350		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
		355					360					365				
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370					375					380					
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
385					390					395					400	
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
				405					410					415		
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
			420					425					430			
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
		435					440						445			
Gly																

<210> 76
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 76

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 77
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Construcción sintética

15

<400> 77

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

ES 2 758 508 T3

```

                165                170                175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
                180                185                190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
                195                200                205
Asn Arg Gly Glu Cys
                210

```

5 <210> 78
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1      5      10      15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
                20      25      30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                35      40      45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
                50      55      60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65      70      75      80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
                85      90      95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
                100     105     110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
                115     120     125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130     135     140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145     150     155     160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
                165     170     175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
                180     185     190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195     200     205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210     215     220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225     230     235     240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
                245     250     255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
                260     265     270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275     280     285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290     295     300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305     310     315     320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                325

```

10 <210> 79
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79

ES 2 758 508 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 325

<210> 80
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 80

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

10

ES 2 758 508 T3

<210> 81
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 81

```

Gln Val Gln Leu Lys Arg Ala Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser
 1          5          10          15
Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ile
      20          25          30
Tyr Gly Ala His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
      35          40          45
Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu
 50          55          60
Met Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe
 65          70          75          80
Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
      85          90          95
Ala Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly
      100          105          110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
      115          120          125
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 130          135          140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145          150          155          160
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165          170          175
Val Leu Glu Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
      180          185          190
Ser Ser Pro Arg Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 195          200          205
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 210          215          220
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 225          230          235          240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
      245          250          255
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
      260          265          270
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 275          280          285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 290          295          300
Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 305          310          315          320
Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325          330          335
Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
      340          345          350
Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
      355          360          365
Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 370          375          380
Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asn Thr Asn Gly
 385          390          395          400
Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
      405          410          415
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
      420          425          430
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
      435          440
    
```

10

ES 2 758 508 T3

<210> 82
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5 <400> 82

```

Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
           20           25           30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
           35           40           45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
           50           55           60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65           70           75           80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
           85           90           95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Ala Asp Ala Ala Pro Thr
           100          105          110
Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
           115          120          125
Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val
           130          135          140
Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser
145          150          155          160
Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr
           165          170          175
Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys
           180          185          190
Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
           195          200          205
Arg Asn Glu Cys
           210
  
```

10 <210> 83
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 83

```

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

ES 2 758 508 T3

		115					120					125			
Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val
	130						135					140			
Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser
145					150					155					160
Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr
				165					170						175
Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys
			180					185					190		
Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn
		195					200					205			
Arg	Asn	Glu	Cys												
	210														

<210> 84
 <211> 450
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

10 <400> 84

Gln	Val	Gln	Leu	Lys	Arg	Ala	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Ala	Pro	Ser
1				5					10					15	
Gln	Ser	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Thr	Ile
		20						25					30		
Tyr	Gly	Ala	His	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu
	50					55					60				
Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Ser	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe
65					70					75					80
Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Thr	Asp	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85						90						95
Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Tyr	Ser	Met	Glu	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115					120						125		
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150					155					160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
				165					170						175
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	195						200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215					220				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250					255	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
			260					265					270		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
		275					280					285			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
	290					295					300				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly

ES 2 758 508 T3

305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly
 450

5 <210> 85
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética

<400> 85

Glu Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

15 <210> 86
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 758 508 T3

<223> Construcción sintética

<400> 86

Gln Ile Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Ser Ile Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Phe Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210

5

<210> 87

<211> 446

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Ala His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
 50 55 60
 Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Gly Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Glu Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130 135 140

ES 2 758 508 T3

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445

<210> 88
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 88

Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5

10

<210> 89
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 89

Asp Tyr Tyr Met Tyr
 1 5

20

<210> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

25

<400> 90

ES 2 758 508 T3

Ser Ser Trp Met Asn
1 5

5 <210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

10 <400> 91
Ile Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

15 <210> 92
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 92
Arg Ile Ala Pro Glu Asp Gly Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

25 <210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

30 <400> 93
Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Tyr Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

35 <210> 94
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

40 <400> 94
His Glu Thr Ala Gln Ala Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

45 <210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

50 <400> 95
Glu Gly Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Leu Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 96

ES 2 758 508 T3

Leu Gly Pro Tyr Gly Pro Phe Ala Asp
 1 5

5 <210> 97
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 97

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

10 <210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 98

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

20 <210> 99
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 99

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

30 <210> 100
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 100

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Tyr
 1 5

40 <210> 101
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 101

Phe Thr Ser Arg Leu His Ser
 1 5

45 <210> 102
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 102

Asp Thr Ser Ser Leu Ala Ser
 1 5

55 <210> 103
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 758 508 T3

<213> Mus musculus

<400> 103

5 Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 104

15 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 105

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 105

Gln Gln Trp Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 106

<211> 120

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 106

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

<210> 107

35 <211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 107

40

ES 2 758 508 T3

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

<210> 108
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

5

<400> 108

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

10

<210> 109
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15

<400> 109

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

20

<210> 110
 <211> 107

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 110

5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr 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 Thr Asn Tyr
          20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Phe 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 Asn Leu Glu Gln
65           70           75           80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
    
```

<210> 111
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

10

<400> 111

```

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

15

<210> 112
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20

<400> 112

```

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
 1           5           10           15
Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
          20           25           30
Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly
 35           40           45
Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala
 50           55           60
    
```

ES 2 758 508 T3

Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
 65 70 75 80
 Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg
 85 90 95
 Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
 100 105 110
 Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys
 115 120 125
 Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro
 130 135 140

<210> 113
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 113

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

10

<210> 114
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 114

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

20

<210> 115
 <211> 373
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 115

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln

```

1           5           10           15
Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
                20                25                30
Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly
                35                40                45
Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala
                50                55                60
Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
65                70                75                80
Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg
                85                90                95
Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
                100                105                110
Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys
                115                120                125
Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro Ile Glu Gly
130                135                140
Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
145                150                155                160
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
                165                170                175
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
                180                185                190
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
                195                200                205
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
210                215                220
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
225                230                235                240
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                245                250                255
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
                260                265                270
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
                275                280                285
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
290                295                300
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
305                310                315                320
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                325                330                335
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
                340                345                350
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
                355                360                365
Leu Ser Pro Gly Lys
370

```

<210> 116
 <211> 460
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116

```

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
1           5           10           15
Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
                20                25                30
Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly
                35                40                45
Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala
50                55                60

```

5

10

ES 2 758 508 T3

Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
65 70 75 80
Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg
85 90 95
Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
100 105 110
Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys
115 120 125
Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro Asp Ile Leu
130 135 140
Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser
145 150 155 160
Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile
165 170 175
Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val
180 185 190
Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys
195 200 205
Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg
210 215 220
Leu Asp Val Ser Ile Glu Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
225 230 235 240
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
275 280 285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335
Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
355 360 365
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
405 410 415
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
420 425 430
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
435 440 445
Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 117
<211> 582
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

Met Glu Gly Asp Arg Gln Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
1 5 10 15
Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
20 25 30
10 Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly

ES 2 758 508 T3

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 545 550 555 560
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 565 570 575
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 580

<210> 118
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Papio spp.

5

<400> 118

Met Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Pro Lys Asp Asp Trp Thr Tyr Ser Asp Pro Val His Gly
 35 40 45
 Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Glu Ala Pro Val Ala
 50 55 60
 Thr Asn Asn Pro Asp Thr Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
 65 70 75 80
 Gln Leu Leu Gly Asp Arg Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Asn
 85 90 95
 Asp Ala Arg Lys Gly Asp Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
 100 105 110
 Gly Arg Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Ala Lys
 115 120 125
 Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr Gln Arg Pro Asp Ile Leu
 130 135 140
 Ile Gln Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser
 145 150 155 160
 Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Arg Met Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile
 165 170 175
 Gly Thr Ser Val Ser Ser Leu Gly Pro Ile Thr Ala Arg Phe Ser Val
 180 185 190
 Leu Thr Leu Ile Pro Lys Pro Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys
 195 200 205
 Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Arg Thr Val Gln
 210 215 220
 Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn Leu Thr Val Thr Val Phe Gln
 225 230 235 240
 Gly Asp Asp Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser
 245 250 255
 Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asp Ser Asn
 260 265 270
 Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro
 275 280 285
 Ser Gln Pro Trp Asn Pro Gly Leu Leu Glu Leu Leu Arg Val His Val
 290 295 300
 Lys Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Gln Ala Glu Asn Pro Arg Gly Ser
 305 310 315 320
 Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr
 325 330 335
 Ala Arg Pro Val Ser Glu Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly Ile Glu
 340 345 350
 Gly Arg Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 355 360 365
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 370 375 380
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

10

ES 2 758 508 T3

385					390					395					400
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
				405					410					415	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
			420					425					430		
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
		435					440					445			
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
	450					455					460				
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
465					470						475				480
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
			485						490					495	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			500					505						510	
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		515					520						525		
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
	530					535						540			
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
545					550					555					560
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
				565					570					575	
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
			580												

<210> 119
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Papio spp.

 <400> 119

5

ES 2 758 508 T3

```

Met Glu Gly Asp Arg Lys Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Leu Gln Val Gln
 1      5      10      15
Glu Leu Val Thr Val Gln Glu Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser
      20      25      30
Phe Ser Tyr Pro Lys Asp Asp Trp Thr Tyr Ser Asp Pro Val His Gly
      35      40      45
Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Glu Ala Pro Val Ala
      50      55      60
Thr Asn Asn Pro Asp Thr Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe
      65      70      75      80
Gln Leu Leu Gly Asp Arg Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Asn
      85      90      95
Asp Ala Arg Lys Gly Asp Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg
      100      105      110
Gly Arg Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Ala Lys
      115      120      125
Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr Gln Arg Pro Asp Ile Leu
      130      135      140
Ile Gln Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser
      145      150      155      160
Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Arg Met Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile
      165      170      175
Gly Thr Ser Val Ser Ser Leu Gly Pro Ile Thr Ala Arg Phe Ser Val
      180      185      190
Leu Thr Leu Ile Pro Lys Pro Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys
      195      200      205
Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Arg Thr Val Gln
      210      215      220
Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn Leu Thr Val Thr Val Phe Gln
      225      230      235      240

Gly Asp Asp Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser
      245      250      255
Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asp Ser Asn
      260      265      270
Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro
      275      280      285
Ser Gln Pro Trp Asn Pro Gly Leu Leu Glu Leu Leu Arg Val His Val
      290      295      300
Lys Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Gln Ala Glu Asn Pro Arg Gly Ser
      305      310      315      320
Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr
      325      330      335
Ala Arg Pro Val Ser Glu Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly
      340      345      350

```

5 <210> 120
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 120

ES 2 758 508 T3

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

<210> 121
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 121

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

10

<210> 122
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 122

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

20

<210> 123
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 758 508 T3

<400> 123

```

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

```

5

<210> 124
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 124

```

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

```

REIVINDICACIONES

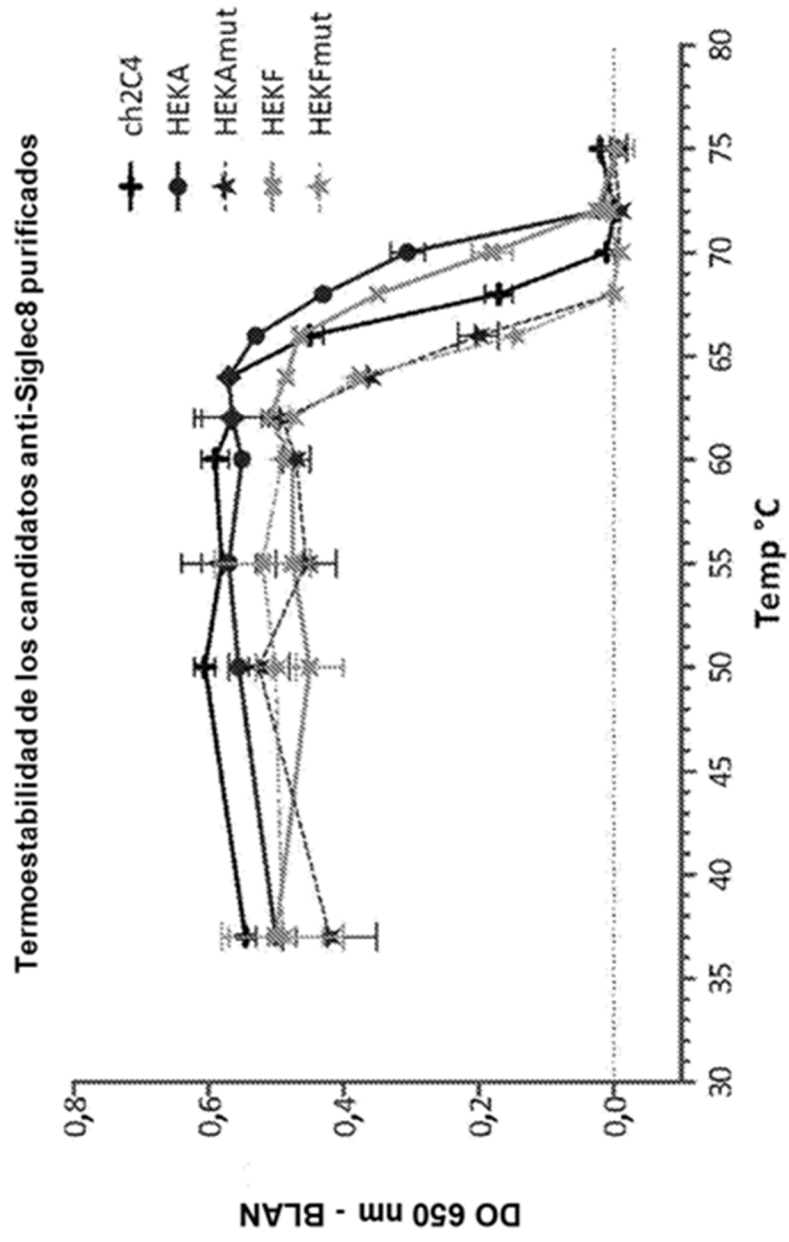
1. Un anticuerpo humanizado que se une a Siglec-8 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde (i) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos las SEQ ID NO: 16 o 21; o (ii)
- 5
- (a) la región variable de la cadena pesada comprende:
- 10 (1) una HC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26;
 (2) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;
 (3) una HC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34;
 (4) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
 (5) una HC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38;
 15 (6) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 63; y
 (7) una HC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y
- (b) la región variable de la cadena ligera comprende:
- 20 (1) una LC-FR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48;
 (2) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64;
 (3) una LC-FR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51;
 (4) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
 (5) una LC-FR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o 58;
 25 (6) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66; y
 (7) una LC-FR4 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i), en donde el anticuerpo comprende una región Fc de cadena pesada que comprende una región Fc de la IgG humana.
- 30
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2 en el que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 humana o de la IgG4 humana.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3 en el que la IgG4 humana comprende la sustitución de aminoácidos S228P, restos numerados según el índice UE como en Kabat.
- 35
5. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i), en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 75 o la SEQ ID NO: 87, y la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76.
- 40
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc que mejora la actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC).
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que una o dos de las cadenas pesadas del anticuerpo no está fucosilada.
- 45
8. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
- 50
10. Una célula hospedadora aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8.
11. La célula hospedadora aislada de la reivindicación 10, en donde la célula hospedadora es una línea celular que tiene una alfa 1,6-fucosiltransferasa (Fut8) desactivada genéticamente o es una línea celular que expresa en exceso la β 1,4-N-acetilglicosaminiltransferasa III (GnT-III).
- 55
12. La célula hospedadora aislada de la reivindicación 11, en la que la línea celular expresa en exceso además Golgi μ -manosidasa II (ManII).
- 60
13. Un método para producir un anticuerpo que comprende cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en una condición que produzca el anticuerpo.
14. Un anticuerpo dirigido contra Siglec-8 producido por un método que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8 o cultivar la célula hospedadora de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en una condición que produce el anticuerpo, en donde la célula hospedadora es una célula de mamífero.
- 65

- 5 15. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 14, en el que el anticuerpo comprende una región Fc y cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos vinculadas con la región Fc, en donde menos del 50 % de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos contienen un resto de fucosa.
16. La composición de la reivindicación 15, en la que prácticamente ninguna de las cadenas de hidratos de carbono unidas a N-glicósidos contienen un resto de fucosa.
- 10 17. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 18. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 14 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, para su uso en un método de terapia.
- 20 19. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 14 o la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 para su uso en un método para tratar una enfermedad seleccionada entre el grupo que consiste de: asma, rinitis alérgica, poliposis nasal, dermatitis atópica, urticaria crónica, mastocitosis, leucemia eosinófila, síndrome hipereosinófilo, asma pauci-granulocítica, hipersensibilidad de las vías aéreas aguda o crónica, esofagitis eosinófila, síndrome de Churg-Strauss, urticaria física, urticaria por frío, urticaria por presión, penfigoide ampolloso, alergia alimentaria, y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).
- 25 20. El anticuerpo para el uso o la composición para el uso de la reivindicación 18, en donde el anticuerpo o la composición inhiben uno o más síntomas de una reacción alérgica, en donde la reacción alérgica es opcionalmente una reacción de hipersensibilidad de Tipo I.
21. El anticuerpo para el uso o la composición para el uso de la reivindicación 18, en donde el método de terapia incluye el agotamiento de mastocitos que expresan Siglec-8 mediante actividad ADCC.
- 30 22. El anticuerpo para el uso o la composición para el uso de la reivindicación 18, en donde el método de terapia incluye el agotamiento de eosinófilos que expresan Siglec-8 mediante actividad ADCC.

FIG. 2

Numeración Kabat	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
Canónica	-I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----A-	
	-I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----A-	
Vernier	-I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----A-	
Interfase	-I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----A-	
Restos Envoltura 4A	-I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----I	-----A-	
m2E2 VK	Q	I	L	T	S	P	A	I	M	S	A	S
X93721	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
X01668	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
Línea germinal	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKA	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKB	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKC	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKD	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKE	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKF	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P
m2E2RKG	E	V	L	T	S	P	A	T	S	L	S	P

FIG. 4



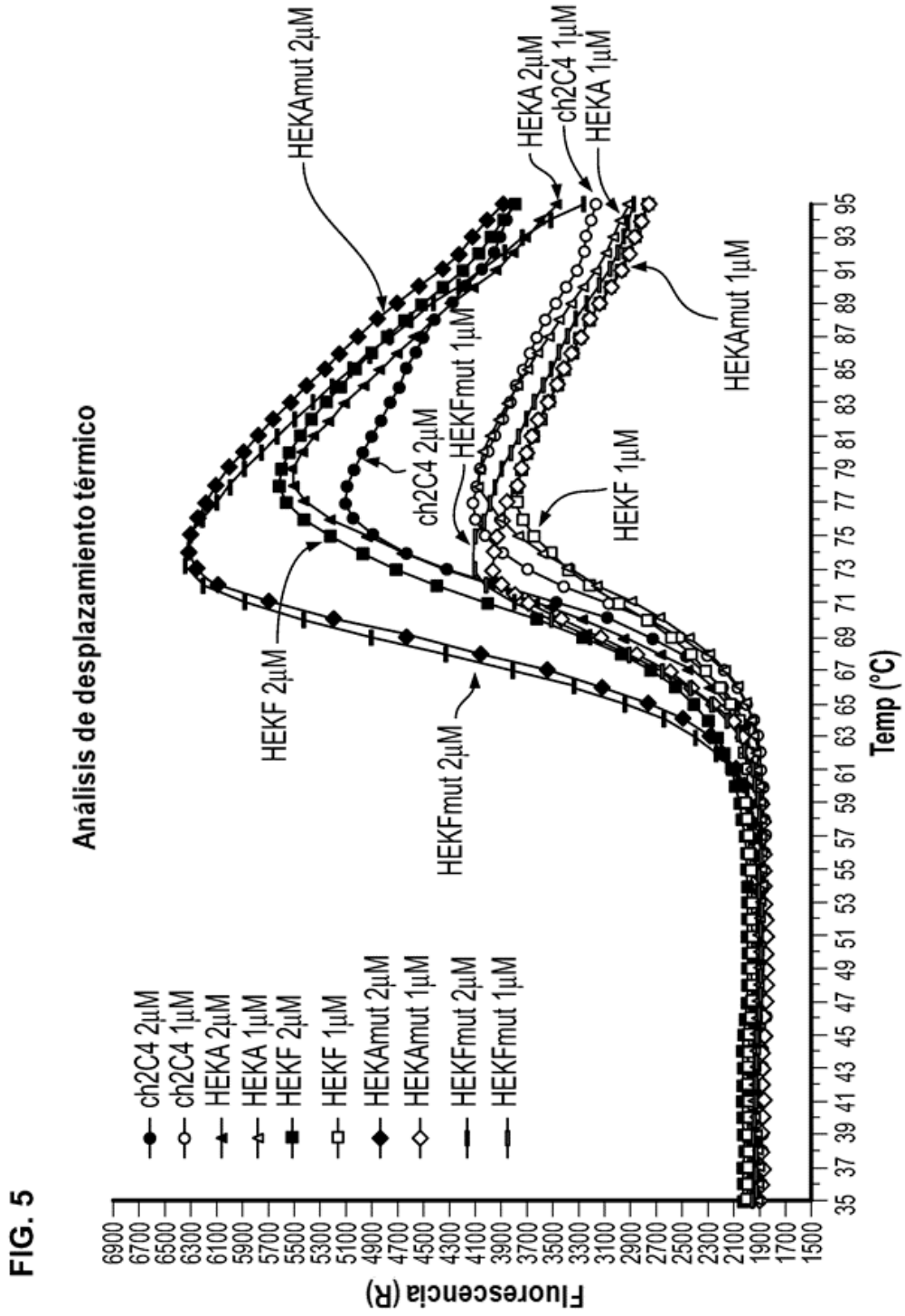
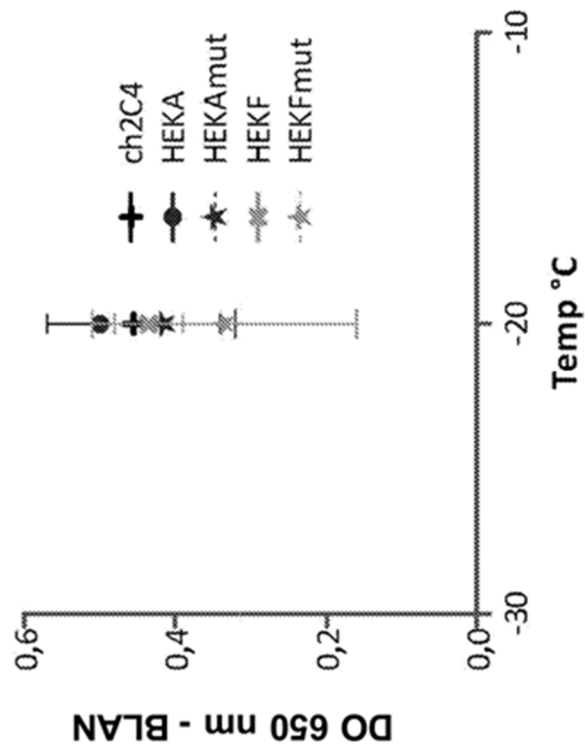


FIG. 6 Termostabilidad de los candidatos anti-Siglec8 purificados a -20 °C



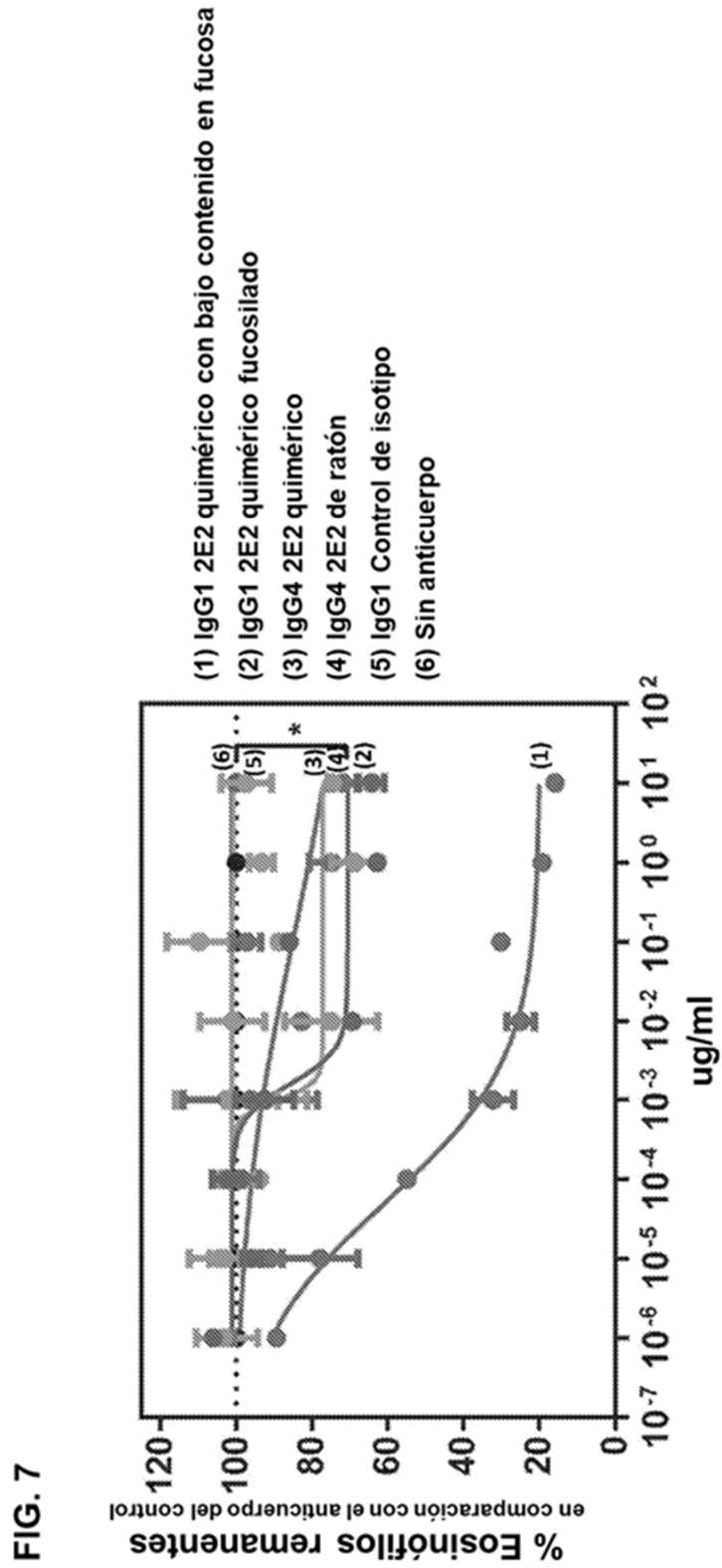


FIG. 8A

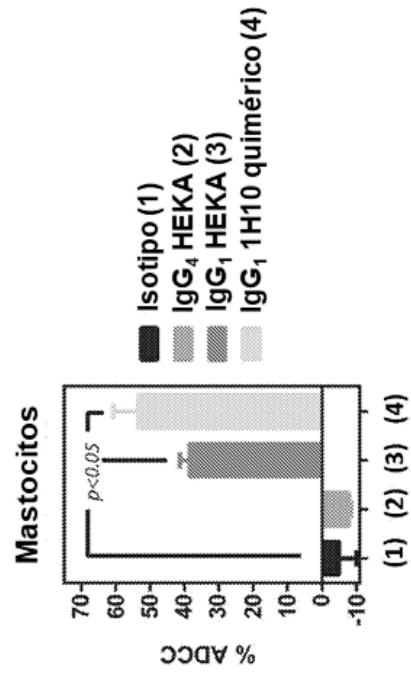
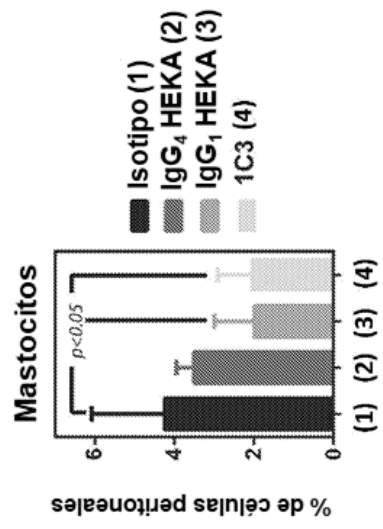


FIG. 8B



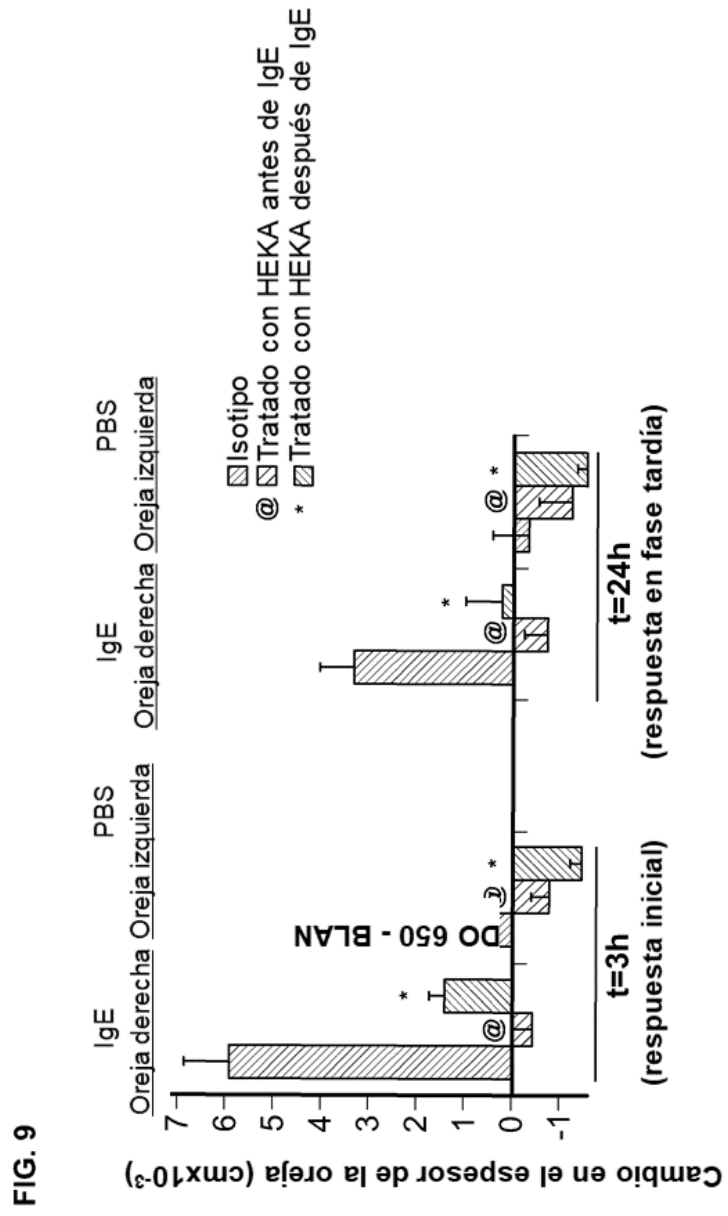


FIG. 10

