SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

CSA847882

PCT

Organización y Digitalización CSA Ltda.

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 97-11862 2

54. **TITULO** ANTICUERPOS ANTI-IGE APOPTÓTICOS UNIENDO IGE UNIDA A LA MEMBRANA

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** GENENTECH, INC.

DOMICILIO S. SAN FRANCISCO, CA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

APODERADO JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

SANTAFE DE BOGOTÀ, D.C.

PETITORIO

AS: 111.401

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-118682- -00000-0000
Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América Lugar de Constitución: Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492
4 INVENTOR (ES) (72)	**Nombre:** Lawren WU, Mercedesz BALAZS, Hans BRIGHTBILL, Andrew CHAN, Yvonne CHEN, Anan CHUNTHARAPAI, Mark DENNIS, Terence WONG. **Dirección**: 1051 Pensacola Street Foster City, California 94404, US; 2735 Driftwood Street Hayward, California 94545, US; 240 Dolores Street, #124 San Francisco, California 94103, US; 1201 Cloud Avenue Menlo Park, California 94025, US; 222 8th Avenue, #320 San Mateo, California 94401, US; 826 Ellis Drive Colma, California 94015, US; 120 Plymouth Avenue San Carlos, California 94070, US; 312 Shell Gate Road Alameda, California 94501, US (respectivamente). **Nacionalidad o Domicilio:** Estados Unidos de América	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2008/057819 Fecha 21.03.2008
Publicación Internacional No WO 2008/116149 A3 Fecha 25.09.2008

6 Título (54): ANTICUERPOS ANTI-IGE APOPTÓTICOS UNIENDO IGE UNIDA A LA MEMBRANA

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	22.03.2007	60/896,339

9 Comprobante de pago No. 09-59.513/09-45.569/ 09-50.55/09-56.160/09-56.196 **Fecha** 19-10 -2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de **presentación** de la solicitud. $ 540.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Copia del éxamen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [x] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12x12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales $1'075.000 (43*$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

111 401

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-118682- -00000-0000

Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 59,513
FECHA : AGOSTO 11 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	303324906	11/08/2009	21,756,320.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL : $	540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

111 401

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 45,569
FECHA : JUNIO 19 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-118682- -00000-0000

Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	114281580	18/06/2009	45,612,320.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
20	50005-01-01 SOLICITUDES	*** REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL	500,000.00
		TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

111 401

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 50,557
FECHA : JULIO 9 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-118682- -00000-0000
Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRISARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946170	08/07/2009	24,289,960.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	500,000.00
			TOTAL : $	500,000.00

SON: QUINIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE NO. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

111 401

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 56,160
FECHA : JULIO 29 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-118682- -00000-0000
Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

**** C O N S I G N A C I O N ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946240	29/07/2009	23,414,840.00

**** C U N C E P T U ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-04 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	50,000.00
		TOTAL : $	50,000.00

SON: CINCUENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

111 401

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 56,196
FECHA : JULIO 29 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-118682- -00000-0000
Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	104946240	29/07/2009	23,414,840.00

***** C U N C E P T U *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI	25,000.00
		TOTAL : $	25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

111401

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
25 September 2008 (25.09.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/116149 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/42 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/057819

(22) International Filing Date: 21 March 2008 (21.03.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/896,339 22 March 2007 (22.03.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **WU, Lawren** [US/US]; 1051 Pensacola Street, Foster City, California 94404 (US). **BALAZS, Mercedesz** [HU/US]; 2735 Driftwood Street, Hayward, California 94545 (US). **BRIGHTBILL, Hans** [US/US]; 240 Dolores Street, #124, San Francisco, California 94103 (US). **CHAN, Andrew** [US/US]; 1201 Cloud Avenue, Menlo Park, California 94025 (US). **CHEN, Yvonne** [CA/US]; 222 8th Avenue, #320, San Mateo, California 94401 (US). **CHUNTHARAPAI, Anan** [US/US]; 826 Ellis Drive, Colma, California 94015 (US). **DENNIS, Mark** [US/US]; 120 Plymouth Avenue, San Carlos, California 94070 (US). **WONG, Terence** [US/US]; 312 Shell Gate Road, Alameda, California 94501 (US).

(74) Agents: **SVOBODA, Craig G.** et al.; c/o GENENTECH, INC., 1 DNA Way MS 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV,

[Continued on next page]

(54) Title: APOPTOTIC ANTI- IGE ANTIBODIES BINDING THE MEMBRANE-BOUND IGE

(57) Abstract: The present application relates to apoptotic anti-IgE antibodies, nucleic acid encoding the same, therapeutic compositions thereof, and their use in the treatment of IgE-mediated disorders.

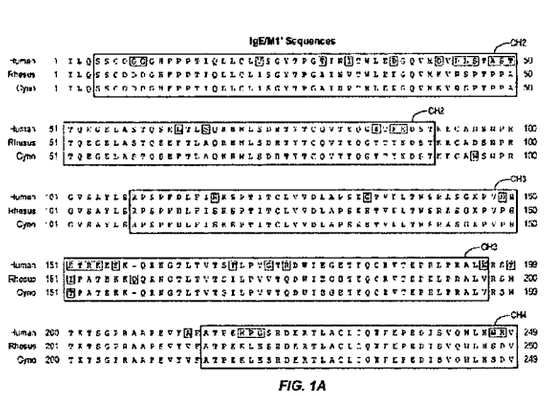


FIG. 1A

FIG. 1B

FIG. 1 FIG. 1A FIG. 1B

WO 2008/116149 A3

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
25 de septiembre de 2008 (25.09.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/116149 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C07K 16/42 (2006.01) *A61P 37/06* (2006.01)

(21) No. Solicitud Internacional:
PCT/US2008/057819

(22) Fecha de Presentación Internacional:
21 de marzo de 2008 (21.03.2008)

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Datos relativos a la Prioridad:
60/896,339 22 de marzo de 2007 (22.03.2007) EU

(71) Solicitante *(para todos los países destinatarios con excepción de EU)*: **GENENTECH, INC.** [EU/EU]; 1 DNA Way, South San Francisco, California 94080 (EU).

(72) (75) Inventores, e Inventores/Solicitantes *(para US unicamente)*: **WU Lawren** [EU/EU]; 1051 Pensacola Street. Foster City, California 94404 (EU); **BALAZS Mercedesz** [HU/EU]; 2735 Driftwood Street, Hayward, California 94545 (EU); **BRIGHTBILL Hans** [EU/EU]; 240 Dolores Street, #124, San Francisco, California, 94103 (EU); **CHAN Andrew** [EU/EU]; 1201 Cloud Avenue, Menlo Park, California 94025 (EU); **CHEN Yvonne** [CA/EU]; 222 8th Avenue, #320, San Mateo, California 94401 (EU); **CHUNTHARAPAI Anan** [EU/EU]; 826 Ellis Drive, Colma, California 94015 (EU); **DENNIS Mark** [EU/EU]; 120 Plymouth Avenue, San Carlos, California 94070 (EU); **WONG Terence** [EU/EU]; 312 Shell Gate Road, Alameda, California 94501 (EU).

(74) Agente: **SVOBODA, Craig G.** et al.; c/o GENENTECH, INC., 1 DNA Way MS 49, South San Francisco, California 94080 (US).

(81) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Países designados *(a menos que se indique lo contrario para cada clase de protección disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- *con el informe internacional de búsqueda.*
- *antes de la fecha limite de expiración para reivindicaciones modificadas y a ser republicado nuevamente en el evento de recibirlas*
- *con el listado de secuencias como parte de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible bajo requerimiento de la Oficina Internacional.*

(88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional:
6 de noviembre de 2008

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-IGE APOPTÓTICOS UNIENDO IGE UNIDA A LA MEMBRANA

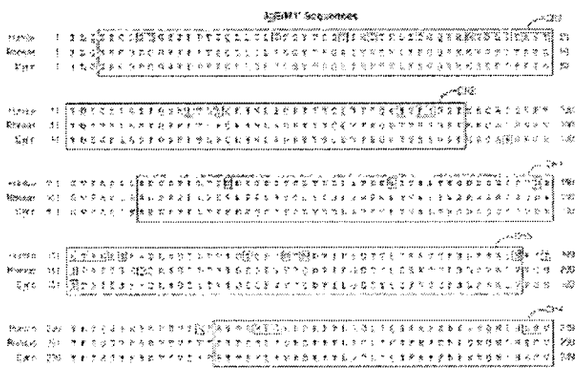


FIG. 1A

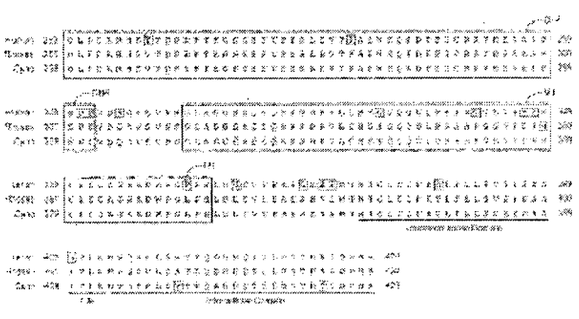


FIG. 1B

(57) Extracto: La presente solicitud guarda relación con anticuerpos anti-IgE apoptóticos, con el ácido nucleico que los codifica, con composiciones terapéuticas de éstos y con su uso en el tratamiento de trastornos mediados por IgE.

ANTICUERPOS ANTI-IGE APOPTÓTICOS UNIENDO IGE UNIDA A LA MEMBRANA

Vigencia retrospectiva

La invención reivindica prioridad, según el Título 35, artículo 119 (e), del Código de Estados Unidos (U.S.C.), para la patente de EE.UU. con nº de serie 60/896.339, presentada el 22 de marzo de 2007.

Antecedentes de la invención

Ámbito de la invención

Esta invención se refiere a los anticuerpos anti-IgE apoptóticos, los ácidos nucleicos que los codifican, las composiciones terapéuticas de los mismos y su uso en el tratamiento de trastornos donde medie la IgE.

Descripción de los métodos relacionados

El término "alergia" se refiere a ciertas enfermedades en que las respuestas inmunes a los antígenos medioambientales causan inflamación tisular y disfunción de los órganos. Las características clínicas de cada enfermedad alérgica reflejan la reacción inflamatoria inducida por respuesta inmunológica en el órgano o tejido implicado. Estas características son por lo general independientes de las propiedades químicas o físicas del antígeno. La diversidad de las respuestas alérgicas surge de la participación de distintas vías efectoras inmunológicas, cada una de las cuales genera un modelo único de inflamación.

La alergia es un hecho común en todo el mundo. No obstante, la predilección por enfermedades específicas varía entre diferentes grupos de edad, sexos y razas. La prevalencia de la sensibilidad a alérgenos específicos viene determinada tanto por predilección genética como los factores geográficos y culturales responsables de la exposición al alérgeno. Un estado clínico de alergia afecta únicamente a algunos individuos que tienen contacto con cada alérgeno. La aparición de una enfermedad alérgica ante la exposición a un alérgeno requiere no sólo una "sensibilización" previa sino también otros factores que determinan la localización de la reacción en un órgano en particular.

Un proceso biológico que precede a la enfermedad de la alergia ante la exposición a un alérgeno induce una respuesta inmunológica conocida como "sensibilización" o fase de sensibilización. Una vez producida la sensibilización, un individuo no comienza a presentar síntomas hasta que vuelva a exponerse al alérgeno. El efecto de la sensibilización también se conoce como memoria inmunológica.

Una de las vías principales por que se induce la inflamación es a través de la inmunoglobulina E (IgE). La IgE desempeña un papel fundamental en las alergias debido a su función como receptor de alérgenos en la superficie de mastocitos y basófilos. Los anticuerpos de la IgE se unen en la superficie de mastocitos y basófilos, en la porción Fc de la molécula, a un receptor en la superficie celular de alta afinidad, llamado FcεRI. La reacción alérgica se inicia cuando la molécula alérgena polivalente se une a los anticuerpos que están ocupando estos receptores. El

resultado es la creación de un puente en el FcεRI, que por su lado señaliza a nivel intracelular causando la liberación y activación de mediadores de la inflamación: histamina, leucotrienos, factores quimiotácticos, factor de activación de plaquetas y proteinasas. Estos mediadores activados actúan localmente y aumentan la permeabilidad vascular, la vasodilatación, la contracción muscular suave y la secreción de la glándula mucosa. Dichos eventos se denominan en términos clínicos *fase inmediata* o *temprana*, y aparecen dentro de los primeros 15-30 minutos tras la exposición a un alérgeno. A lo largo de las 12 horas siguientes, células inflamatorias, procedentes de neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares, se infiltran en el tejido de forma progresiva como respuesta a otros mediadores químicos cuya función todavía no se ha llegado a comprender por completo. Este período de 6-12 horas tras la exposición al alérgeno se designa como *fase tardía* y se caracteriza por manifestaciones clínicas de inflamación celular. Dado que estas reacciones de fase tardía, especialmente en el pulmón, se producen en ausencia de reacciones de fase temprana, aún no se ha llegado a comprender del todo si en ellas necesariamente media la IgE.

La IgE existe en forma unida a la membrana y en forma secretada. Estas formas distintas parecen ser variantes de empalme. Los primeros planteamientos para lograr un efecto terapéutico mediante la regulación a la baja de la IgE se centraron principalmente en la forma secretada (*por ejemplo*, XOLAIR® omalizumab), a fin de evitar o desactivar una mayor "activación" del sistema inmunológico. La forma secretada de IgE es más corta, esencialmente los extremos de la región Fc en el dominio CH4 (Figura 1), mientras que la forma más larga incluye residuos adicionales en el extremo C terminal, incluyendo los péptidos codificados por los exones conocidos como M1/M1' y M2. Si bien algunos han hablado de la existencia de dos formas distintas de IgE unida a la membrana, ambas con y sin un segmento de 52 aminoácidos conocido como M1' [Batista *y col., J. Exp. Med.*, 184: 2197-2205 (1996)], los solicitantes no fueron capaces de verificar que cualquier forma unida a la membrana careciese de este segmento M1'. La terapia convencional con anticuerpos anti-IgE, que se unen a la forma secretada de IgE, resulta en la reducción de IgE libre en suero pero no IgE total en suero. Casale *y col., J. Allergy Clin. Immunol.*, 100 (1): 110-121 (1997).

También se ha destacado que, en ausencia de señal del antígeno, los receptores de células B (*es decir*, las inmunoglobulinas) con enlaces cruzados son propensos a la apoptosis. Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que la acción de anticuerpos anti-IgE en el segmento M1' de la IgE puede inducir la apoptosis de las células B. Debido a que la progenie de células B activadas puede resultar en células plasmáticas que generan y secretan la forma secretada de IgE, la reducción a través de la apoptosis de las células B que producen IgE ofrece un enfoque terapéutico novedoso para el tratamiento de la alergia.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-IgE apoptóticos, o fragmentos funcionales de los mismos, y su uso en el tratamiento de trastornos donde medie la IgE. La invención también ofrece composiciones y métodos para inhibir la producción y secreción de IgE a partir de células B. Además, la invención proporciona composiciones y métodos para reducir de forma específica las células B que producen IgE y el nivel de IgE total en suero.

En una forma de realización, la invención ofrece un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE. En un aspecto específico, el anticuerpo reduce específicamente las células B que producen IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE tanto libre como total en suero. En otro aspecto más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno.En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se une a una IgE que es humana, de mono Rhesus y macaco cinomolgo en su origen. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es quimérico. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es humanizado. En otro aspecto aún más específico, el anticuerpo es humano.

En otra forma de realización, la invención ofrece un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente a cualquiera de los epítopos de M1' correspondientes a los péptidos identificados en la figura 5. En un aspecto específico, el anticuerpo se une de forma específica al mismo epítopo que el ligado por un anticuerpo seleccionado del grupo formado por: 47H4, 7A6, 26A11, 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6. En otro aspecto específico, el anticuerpo se une a epítopo correspondiente a un péptido seleccionado del grupo formado por: péptido 4 (identificador de secuencia nº 8), péptido 5 (identificador de secuencia nº 9), péptido 7 (identificador de secuencia nº 11) o péptido 8 (identificador de secuencia nº 12). En otro aspecto específico más, el anticuerpo se une al péptido 4 (identificador de secuencia nº 8).

En otra forma de realización, la invención proporciona un epítopo de M1' de IgE seleccionado del grupo formado por: péptido 4 (identificador de secuencia nº 8), péptido 5 (identificador de secuencia nº 9), péptido 7 (identificador de secuencia nº 11) o péptido 8 (identificador de secuencia nº 12). En un aspecto específico, el péptido de M1' es el péptido 4 (identificador de secuencia nº 8).

En otra forma de realización, la invención ofrece un anticuerpo anti-IgE que se une específicamente a un segmento M1' de IgE con una afinidad de unión Scatchard a la IgE humana equivalente a la del anticuerpo anti-IgE/M1' murino 47H4 o su variante humanizada. En un aspecto específico, la afinidad es equivalente a la afinidad de unión del 47H5. En otro aspecto específico, la afinidad oscila entre 0,30 y 0,83 nm. En otro aspecto específico, la afinidad es equivalente a la afinidad de unión del 47H4v5. En un aspecto más específico, la afinidad es de alrededor de 1,5 nm.

En otra forma de realización, la invención proporciona un anticuerpo anti-IgE/M1' que contiene las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F y 20-25. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende también las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de las secuencias del anticuerpo que aparecen en cualquiera de las figuras 6A-6F y 20-25. En otro aspecto específico, el anticuerpo contiene las cadenas pesada y ligera de longitud completa de los anticuerpos que aparecen en cualquiera de las figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, las cadenas pesada y ligera de las secuencias del anticuerpo aparecen en cualquiera de las figuras 6A-6F. En un aspecto más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es afucosilado.

En otra forma de realización, la invención ofrece una composición formada por un anticuerpo anti-IgE/M1' que contiene las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F en combinación con al menos un vehículo con cualidades farmacéuticas aceptables. En un aspecto específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En otro aspecto específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En otro aspecto aún más específico, el anticuerpo es afucosilado.

En otra forma de realización, la invención proporciona una composición formada por un anticuerpo anti-IgE/M1' que contiene las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 8-13 en combinación con uno o más fármacos seleccionados del grupo formado por: anticuerpos anti-IgE, antihistamínicos, broncodilatadores, glucocorticoides, NSAID, antagonistas del TNF, antagonistas de la integrina, agentes inmunosupresores, antagonistas de IL-4, antagonistas de IL-13, antagonistas dobles de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpos que se unan a un marcador en la superficie de células B y antagonistas del BAFF. En un aspecto específico, la composición también contiene al menos un vehículo con cualidades farmacéuticas aceptables.

En otra forma de realización, la invención ofrece un ácido nucleico aislado que codifica las HVR de la cadena pesada del anticuerpo anti-IgE/M1' que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En un aspecto específico, el ácido nucleico aislado también comprende el ácido nucleico que codifica las HVR de la cadena ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el anticuerpo es quimérico. En otro aspecto específico más, el anticuerpo es humanizado. En otro aspecto, el anticuerpo es humano. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es afucosilado. En otro aspecto más, el ácido nucleico también comprende un vector apto para su expresión. En otro aspecto aún más específico, el vector también comprende una célula anfitrión apta para la expresión del ácido nucleico. En otro aspecto aún más específico, la célula anfitrión es eucariótica o procariótica. En otro aspecto aún más específico, la célula eucariótica es de mamífero, como las de ovario de hámster chino (CHO).

En otra forma de realización, la invención proporciona un proceso para crear un anticuerpo anti-IgE/M1', o un fragmento funcional del mismo, que se une específicamente a un segmento M1' de IgE, que consiste en cultivar una célula anfitrión que contiene el ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento de una forma apta para la expresión, en condiciones adecuadas para producir dicho anticuerpo o fragmento, y después recuperar dicho anticuerpo o fragmento.

En otra forma de realización, la invención ofrece un artículo fabricado que consiste en un envase que contiene una composición divulgada en la presente memoria descriptiva y un prospecto en que se indica su uso para el tratamiento de un trastorno donde medie la IgE. En un aspecto específico, el artículo fabricado es un vial. En otro aspecto específico, el artículo fabricado es una jeringa previamente rellenada. En otro aspecto específico, la jeringa previamente rellenada se presenta en el interior de un dispositivo de inyección. En un aspecto más específico, el dispositivo de inyección es un autoinyector.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para reducir de forma específica las células B que producen IgE que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto específico, el método reduce el nivel de IgE tanto libre como total en suero. En un aspecto específico más, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En otra forma de realización, la invención ofrece un método para tratar un trastorno donde medie la IgE que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE. En un aspecto específico, el anticuerpo reduce específicamente las células B que producen IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE tanto libre como total. En un aspecto más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC. En un aspecto aún más específico, el trastorno donde medie la IgE se selecciona del grupo formado por: rinitis alérgica, asma (*por ejemplo*, asma alérgica y no alérgica), dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, hipersensibilidad (*por ejemplo*, anafilaxis, urticaria, alergias a alimentos, *etc.*), aspergilosis broncopulmar alérgica, enfermedades parasitarias, cistitis intersticial, síndrome de híper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia atímica, mieloma de IgE y reacción injerto-frente-a-anfitrión. En un aspecto aún más específico, el trastorno donde medie la IgE es alergia a alimentos, anafilaxis, dermatitis por contacto y púrpura alérgica.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para tratar un trastorno donde medie la IgE que consiste en administrar una composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE en combinación con una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un fármaco seleccionado del grupo formado por: anticuerpos anti-IgE, antihistamínicos, broncodilatadores, glucocorticoides, NSAID, descongestionantes, antitusivos, analgésicos, antagonistas del TNF, antagonistas de la integrina, agentes inmunosupresores, antagonistas de IL-4, antagonistas de IL-13, antagonistas dobles de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpos que se unan a un marcador en la superficie de células B y antagonistas del BAFF. En un aspecto específico, el anticuerpo reduce específicamente las células B que producen

IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE tanto libre como total. En un aspecto más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para tratar un trastorno donde medie la IgE que consiste en un régimen de tratamiento combinado en que se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE antes de, simultáneamente con o después de un método conocido de tratamiento para trastornos alérgicos. En un aspecto específico, la combinación consiste en la administración de un anticuerpo anti-IgE, un antihistamínico, un broncodilatador, un glucocorticoide, un antiinflamatorio no esteroide, un inmunosupresor, un antagonista de IL-4, un antagonista de IL-13, un antagonista doble de IL-4/IL-13, un descongestionante, un antitusivo o un analgésico. En otro aspecto específico, el anticuerpo anti-IgE/M1' se administra en combinación con un régimen de tratamiento de desensibilización a alérgenos. En un aspecto específico, el anticuerpo reduce específicamente las células B que producen IgE. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto específico, el anticuerpo reduce el nivel de IgE tanto libre como total. En un aspecto más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En otra forma de realización, la invención ofrece un método para evitar la producción de IgE inducida por alérgenos que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis en las células B que expresan IgE. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método reduce específicamente las células B que producen IgE. En otro aspecto específico más, el método reduce el nivel de IgE total en suero. En otro aspecto más específico, el método reduce el nivel de IgE tanto libre como total en suero. En un aspecto aún más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En otra forma de realización, la invención proporciona un método para reducir la producción de IgE inducida por alérgenos que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une de forma específica al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis

en las células B que expresan IgE. En un aspecto específico, el anticuerpo comprende las HVR de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo que aparece en cualquiera de las figuras 6A-6F. En otro aspecto específico, el método reduce específicamente las células B que producen IgE. En otro aspecto más específico, el método reduce el nivel de IgE total en suero. En un aspecto aún más específico, el método reduce el nivel de IgE tanto libre como total en suero. En un aspecto aún más específico, la IgE en suero es específica para el alérgeno. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo se selecciona del grupo formado por: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4 ó 47H4v1-6. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo es el 47H4v5. En un aspecto aún más específico, el anticuerpo tiene actividad ADCC.

En otra forma de realización, la invención ofrece una composición útil para cualquiera de los métodos anteriormente descritos.

En otra forma de realización, la invención proporciona el uso de una composición para cualquiera de los métodos anteriormente descritos.

En otra forma de realización, la invención ofrece un hibridoma murino depositado en la ATCC el 21 de marzo de 2007 con una designación seleccionada del grupo formado por: 7A6.18, 1C11.10.20, 47G4.6.2, 47H4.12.10, 42H4.6.9, 42A5.20.11, 26A11.6.5, 51D2.22.15, 45C1.6.14, 26B11.3.12, 28E9.12.9. En un aspecto específico, la invención proporciona un anticuerpo secretado por el hibridoma depositado.

En otra forma de realización, la invención proporciona un animal transgénico que expresa el segmento M1' humano de la IgE.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** es una alineación de regiones seleccionadas de cadena constante de IgE del ser humano (identificador de secuencia nº 1), el mono Rhesus (identificador de secuencia nº 2) y el macaco cinomolgo (identificador de secuencia nº 3). Se muestran las ubicaciones aproximadas de los dominios CH2, CH3, CH4, M1', transmembrana e intracelular.

La **figura 2** son gráficas de análisis FACS Scatchard que muestran la especificidad de los diversos anticuerpos anti-M1'. En la **figura 2A** se muestra la unión a la forma corta de IgE (carente de M1'), mientras que en la **figura 2B** se muestra la unión a la forma larga (con M1'). En la **figura 2C** se muestra la unión a la IgE expresada por la línea celular U266. La línea roja indica la fluorescencia intensiva del anticuerpo de control, mientras que la azul indica la fluorescencia relativa del anticuerpo sometido a prueba. En las **figuras 2D-F** se muestran las especificidades de unión de los anticuerpos anti-IgE/M1' murinos 47H4, 26A11 y 7A6. En la **figura 2D** se muestra que el 47H4 se une a la IgE/M1' del ser humano, el mono Rhesus y el macaco cinomolgo, pero no a la IgE que carece de M1'. En la **figura 2E** se muestra que el 47H4 se une a U266, mientras que 26A11 y 7A6 no lo hacen. En la figuras 2F se muestra que el 47H4 y el 7A6 se unen al M1' tanto de mono Rhesus como macaco cinomolgo, mientras que el 26A11 sólo se une al del mono Rhesus. En las **figuras 2G-I** se muestran las especificidades de unión de los anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados 47H5v5,

26A11v6 y 7A6v1. En la **figura 2G** se muestra que las tres variantes humanizadas 47H4v5, 26A11v6 y 7A6v1 son específicas para IgE-M1' pero no para la IgE carente de M1'. En la **figura 2H** se muestra que las variantes 47H4v5 y 26A11v6 (pero no 7A6v1) se unen a U266. En la **figura 2I** se muestra que 47H4v5 y 7A6v1 se unen al M1' de mono Rhesus y macaco cinomolgo, mientras que el 26A11v6 sólo se une al del mono Rhesus.

Las **figuras 3A-L** son gráficas de análisis FACS que muestran las afinidades de unión relativas de los diversos anticuerpos anti-M1' usando las diluciones en serie indicadas en la **figura 3M**. En la **figura 3N** se muestran las afinidades relativas de cada anticuerpo. En la **figura 3O** se resumen las afinidades de los anticuerpos murinos 47H4, 26A11 y 7A6 medidas mediante análisis Scatchard con relación al M1' humano, de mono Rhesus y macaco cinomolgo. A menos que se indique lo contrario, las cifras indicadas son promedios. En la **figura 3P** se resumen las afinidades de las variantes humanizadas indicadas de los anticuerpos 47H4 y 26A11 medidas mediante análisis Scatchard con relación al M1' humano, de mono Rhesus y macaco cinomolgo.

En las **figuras 4A-D** se muestra un estudio de unión/bloqueo relativo de los anticuerpos anti-M1'. La **figura 4A** es una gráfica de un análisis FACS que muestra los anticuerpos que bloquearon, total o parcialmente, la unión. La **figura 4B** es una gráfica bidimensional que muestra la capacidad relativa para bloquear la unión de los otros anticuerpos (parcial o totalmente empleando una relación molar 1:1). La **figura 4C** es una gráfica bidimensional más centrada en los anticuerpos específicamente indicados en que el estudio de bloqueo se repitió con una relación molar de 10:1. La **figura 4D** es un esquema que muestra las agrupaciones resultantes de los estudios de unión/bloqueo de epítopos.

En las **figuras 5A-C** se muestran los estudios de unión de epítopos realizados con 47H4, 7A6 y 26A11. En la **figura 5A** se muestra el segmento de M1', incluyendo los residuos de los extremos N y C terminales adyacentes (identificador de secuencia nº 3), y los péptidos 1-5 de M1' (identificadores de secuencia nºs 5-19), respectivamente, utilizado para determinar la unión de epítopos. En las **figura 5B y 5D** se muestra que el anticuerpo original murino 47H4 se une al péptido 4, el 7A6 se une a los péptidos 4 y 5 y el 26A11 se une a los péptidos 7 y 8. En las **figuras 5C y 5E** se muestra que la variante humanizada 47H4v5 se une al péptido 4, mientras que la 7A67v1 se une a los péptidos 4 y 5 y la 26A11v6 se une a los péptidos 7 y 8, conservando por tanto las especificidades de los epítopos de los anticuerpos originales murinos.

En las **figuras 6A-F** se muestran las secuencias de las cadenas variables ligera y pesada de los anticuerpos murinos 26A11, 7A6 y 47H4 y sus diversas variantes humanizadas. Las posiciones están numeradas según Kabat, y las regiones hipervariables que se injertaron en la red variable de consenso (Kappa I para la cadena ligera, subgrupo III para la pesada) están en casillas. En la **figura 6A** se muestra, con relación a la cadena ligera kappa I humana (identificador de secuencia nº 20), la cadena ligera variable de 26A11 (identificador de secuencia nº 21) y las variantes humanizadas 1,4

(identificador de secuencia nº 22), las variantes 2,5 (identificador de secuencia nº 23), las variantes 3,6 (identificador de secuencia nº 24), las variantes 13,15 (identificador de secuencia nº 25) y las variantes 14,16 (identificador de secuencia nº 26). En la **figura 6B** se muestra, con relación a la cadena ligera kappa I humana (identificador de secuencia nº 20), la cadena ligera variable de 7A6 (identificador de secuencia nº 27) y la variante humanizada 1 (identificador de secuencia nº 28). En la **figura 6C** se muestra, con relación a la cadena ligera kappa I humana (identificador de secuencia nº 20), la cadena ligera variable de 47H4 (identificador de secuencia nº 29) y las variantes humanizadas 1,3 (identificador de secuencia nº 30) y 2-4,6 (identificador de secuencia nº 31). En la **figura 6D** se muestra, con relación a la cadena pesada III humana (identificador de secuencia nº 32), la cadena pesada variable de 26A11 (identificador de secuencia nº 33) y las variantes humanizadas 1-3, 13, 14 (identificador de secuencia nº 34) y las variantes 4-6, 15, 16 (identificador de secuencia nº 35). En la **figura 6E** se muestra, con relación a la cadena pesada humana (identificador de secuencia nº 34), la cadena pesada variable de 7A6 (identificador de secuencia nº 26) y la variante humanizada 1 (identificador de secuencia nº 37). En la **figura 6F** se muestra, con relación a la cadena pesada III humana (identificador de secuencia nº 32), la cadena pesada variable de 47H4 (identificador de secuencia nº 38) y las variantes humanizadas 1,2 (identificador de secuencia nº 39), las variantes 3-4 (identificador de secuencia nº 40), la variante 5 (identificador de secuencia nº 41) y la variante 6 (identificador de secuencia nº 41).

En las figuras **7A-G** se muestra la actividad apoptótica de los anticuerpos anti-M1' originales en células Daudi transfectadas con IgE-M1'. La **figura 7A** es una gráfica de un análisis FACS que muestra esencialmente que la IgM se expresa a un nivel superior que la IgE. En la **figura 7B** se muestra el efecto de anticuerpos anti-IgM [$F(ab')_2$] con enlaces cruzados y la aplicación de la camptotecina en la inducción de la apoptosis, respectivamente. Las células que en prueba de tinción presentan un nivel positivo de anexina pero negativo de PI están muriendo, mientras que las que presentan un nivel positivo tanto de anexina como PI ya están muertas. La **figura 7C** es una representación gráfica de la apoptosis total observada, en que la barra de tono claro muestra las células con un nivel positivo de anexina y negativo de PI, mientras que la barra de tono oscuro muestras las células con un nivel positivo tanto de anexina como PI. Las figuras **7D-7G** son representaciones gráficas de la apoptosis inducida por anticuerpos anti-M1' a concentraciones de 25, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 μg/ml. En la **figura 7D** se muestran los resultados de la aplicación de los anticuerpos de M1' del grupo de epítopos A1, incluyendo 7A6, 47H4, 47G4, 42A5, 42H4 (junto con los anticuerpos de control MAE-11 y GP120) sin enlaces cruzados. En la **figura 7E** se muestran los resultados de la aplicación de los anticuerpos de M1' del grupo de epítopos A2, incluyendo 1C11, 26A11, 51D2 y 45C1, y el grupo de epítopos B/C, incluyendo 26B11 y 28E9 sin enlaces cruzados. En la **figura 7F** se muestra el grupo de epítopos A1 con enlaces cruzados, y en la **figura 7G** se muestran los grupos de epítopos A2 y B/C con enlaces cruzados.

En las figuras **8A-B** se muestra la actividad apoptótica de las variantes humanizadas anti-M1' en células Daudi transfectadas con IgE-M1' tratada con diversas variantes humanizadas de anticuerpos

anti-M1' a concentraciones de 25, 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001 µg/ml. En la **figura 8A** se muestra que las variantes humanizadas 47H4v5, 26A11v6 y 7A6v1 inducen la apoptosis en el rango del 30-40% a los niveles de concentración superiores (*es decir*, las variantes 47H4 y 26A11 a 10-25 µg/ml y la variante 7A6 a 1, 10 y 25 µg). En la **figura 8B** se muestra la actividad apoptótica del mismo anticuerpo en células Daudi transfectadas con IgE-M1' tratadas en presencia del anticuerpo de cabra antihumano IgG F(ab')2 con enlace cruzado. Todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos del 70-90%, con algún descenso de la actividad apoptótica a concentraciones altas (*por ejemplo*, 47H4 -v1, -v2, 26A11 -v1, -v14). En la **figura 8C** se muestra que el anticuerpo 47H4v5, en sus variantes tanto natural como afucosilada, fue capaz de inducir la apoptosis a niveles similares.

En las **figuras 9A-B** se muestra la capacidad de los anticuerpos anti-M1' murinos para inducir el flujo de calcio en células Daudi-IgE/M1'. La **figura 9A** es el control que muestra el efecto de anti-IgM y MAE11, mientras que en la **figura 9B** se muestra el efecto de la aplicación de los anticuerpos anti-M1' murinos indicados.

En la **figura 10** se muestra la capacidad de las variantes natural y afucosilada del anticuerpo anti-IgE/M1' humanizado 47H4 para inducir la ADCC. Mientras que las variantes natural y afucosilada inducen un nivel máximo de citotoxicidad similar, la variante afucosilada ("AF") fue más potente que la forma natural (EC50 afucosilado ≈ 0,83 nM, EC50 natural ≈ 6,6 nM).

Las **figuras 11A-F** son secuencias de longitud completa de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-IgE/M1' murinos. Las regiones variables se muestran en cursiva, mientras que las HVR (regiones hipervariables) aparecen subrayadas. En la **figura 11A** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 7A6 (identificadores de secuencia n°s 43 y 44), respectivamente. En la **figura 11B** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 47H4 (identificadores de secuencia n°s 45 y 46), respectivamente. En la **figura 11C** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 26A11 (identificadores de secuencia n°s 47 y 48), respectivamente. En la **figura 11D** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 45C1 (identificadores de secuencia n°s 49 y 50), respectivamente. En la **figura 11E** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 28E9 (identificadores de secuencia n°s 51 y 52), respectivamente. En la **figura 11F** se muestran las cadenas pesada y ligera del anticuerpo murino 1C11 (identificadores de secuencia n°s 53 y 54), respectivamente.

En las **figuras 12A-I** se demuestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' murinos para inhibir la producción de IgE en suero y células plasmáticas que producen IgE en un modelo hu-SCID atópico. La **figura 12A** es una representación gráfica del diseño experimental. En las **figuras 12B-C** se muestra que el tratamiento con los anticuerpos anti-IgE/M1' murinos redujo los niveles de IgE en un 65-84%. En las **figuras 12D-E** se muestra que la reducción de las células que producen IgE en vivo fue del 19-69%. En las **figuras 12F-G** se muestra que los niveles de otras inmunoglobulinas

(*por ejemplo*, IgG1-4, IgA, IgM) no se vieron relativamente afectados. En las **figuras 12H-I** se muestra que no se observó reducción alguna en la cantidad total de células plasmáticas del bazo.

En las **figuras 13A-H** se muestra el efecto de la variante humanizada de 47H4v5 en los niveles de inmunoglobulina en el modelo hu-SCID atópico. La **figura 13A** es una representación gráfica del diseño experimental. En las **figuras 13B-D** se muestra que la IgE en suero se redujo en un 79% y las células plasmáticas que producen IgE lo hicieron en un 75%. En las **figuras 13E-F** se muestra que no hubo reducción de los niveles de otras inmunoglobulinas en suero. En las **figuras 13G-H** se muestra que no hubo reducción de los niveles totales de células plasmáticas, demostrando así que el anticuerpo 47H4 reduce específicamente las células plasmáticas que producen IgE, que representan una proporción muy pequeña de la cantidad total de células plasmáticas.

En las **figuras 14A-D** se ilustra la generación de huM1' murino bloqueado. En la **figura 14A** se muestra la ubicación del exón de M1' en el locus de IgE murina. En la **figura 14B** se muestra un esquema de la recombinación en el locus de IgE murina que da como resultado la creación del alelo objetivo. En la **figura 14C** se muestra la definición de un genotipo mediante PCR para una banda de 668 bp en la variante murina natural y una banda de 457 bp en las formas bloqueadas de M1'. En la **figura 14D** se muestra un Southern blot en que un fragmento HindIII de 7,4 kb en la variante murina natural se convierte en un fragmento de 3 kb en las formas bloqueadas de hu-M1', y un fragmento BamHI de 14,1 kb se convierte en un fragmento de 18,1 en el alelo bloqueado de hu-M1'. Se muestran ambas variantes murinas natural y heterocigótica.

En las figuras **15A-I** se muestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para evitar la generación de IgE en una respuesta inmune primaria. La **figura 15A** es un esquema en que se muestra el cronograma del diseño experimental, incluyendo la administración de TNP/OVA y anticuerpos anti-IgE/M1'. La **figura 15B** es una gráfica de los niveles de IgE específica para el antígeno a lo largo del tiempo y muestra que si bien los niveles de IgE específica para el antígeno en los animales de control (*es decir*, gp120) alcanzaron niveles máximos entre los días 8 y 14, la acción de los anti-IgE/M1' evitó cualquier aumento, y los niveles medidos de IgE específica para el antígeno no fueron significativamente distintos a los de ratones no inmunizados. En las **figuras 15C-D** se muestra que el tratamiento con anti-IgE/M1' evitó el aumento de IgE en suero específica para el antígeno en los días 8 y 14, respectivamente, y no fue distinto en términos estadísticos del resultado en ratones no inmunizados (Figura **15E**). En las **figuras 15F-I** se muestra que los anticuerpos anti-IgE/M1' no afectaron de forma significativa a los niveles de IgG1 específica para el antígeno a lo largo de los 28 días de duración del experimento (excepto una modesta diferencia en el día 14).

En las figuras **16A-K** se muestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para evitar la generación de IgE específica para el antígeno en una respuesta inmune de memoria o secundaria. La **figura 16A** es un esquema en que se muestran los cronogramas del aumento secundario de TNP-OVA y la administración de anticuerpos anti-IgE/M1', que se administraron por primera vez el

día 28. La **figura 16B** es una gráfica de los niveles de IgE específica para el antígeno a lo largo del tiempo y muestra que la respuesta secundaria de la IgE específica para el antígeno al aumento de TNP-OVA en el día 28 es más rápida, alcanzando niveles máximos al cabo de 4 días en lugar de los 8-9 días que se tardaba en la respuesta primaria. En las **figuras 16C-D** se muestra que los niveles de IgE específica para el antígeno en animales tratados con anti-IgE/M1' se redujeron de forma significativa en comparación con los isotipos de control, un 59-65% hacia el día 32 y un 90-93% hacia el día 35. En la **figura 16E** se muestra que hacia el día 42 (12 días después de la administración inicial de anti-IgE), los niveles de IgE específica para el antígeno se redujeron a un nivel que no era estadísticamente distinto del de los ratones de control que no se habían tratado. En las **figuras 16F-H** se muestra que entre los días 28 y 49, la administración de anti-IgE/M1' redujo los niveles de IgE en suero en un 74-84%, y el nivel diario medio de IgE específica para el antígeno también se redujo en un 74-83%. En las **figuras 16I-K** se muestra que los anticuerpos anti-IgE/M1' no afectaron de forma significativa a los niveles de IgE específica para el antígeno.

Las **figuras 17A-D** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para reducir de forma preventiva la producción de IgE en respuesta a una infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **figura 17A** es un esquema en que se muestra el diseño experimental. Los animales se trataron tres veces a la semana empezando el día 0 y hasta el día 21. En la **figura 17B** se muestran los niveles de IgE a lo largo del tiempo en respuesta a una infección por NB con anticuerpos anti-IgE/M1' y de control. En las **figuras 17C-D** se muestra que en el día 15, los animales tratados con anti-IgE/M1' presentaron unos niveles reducidos de IgE en suero que no eran estadísticamente significativos con relación a los de los ratones no infectados.

Las **figuras 18A-I** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para tratar terapéuticamente la respuesta máxima de la IgE a la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **figura 18A** es un esquema en que se muestra el diseño experimental. Los animales se trataron tres veces a la semana entre los días 11 y 21. En la **figura 18B** se muestran los niveles de IgE a lo largo del tiempo en respuesta a una infección por NB con anticuerpos anti-IgE/M1' y de control. En las **figuras 18C-D** se muestra que los anticuerpos anti-IgE/M1' redujeron los niveles de IgE en suero en un 82-89% al cabo de cuatro días de tratamiento. En la **figura 18E** se muestra que hacia el día 21, los niveles de IgE en animales tratados con anti-IgE/M1' se redujeron en un 97-98%, alcanzando niveles que no fueron estadísticamente significativos con relación al grupo de control no infectado. En las **figuras 18F-G** se muestra que las células plasmáticas que producen IgE (tal como Elispot cuantifica) en los nódulos linfáticos y el bazo se redujeron en un 88-94% y un 57-66%, respectivamente. En las **figuras 18H-I** se muestra que la cantidad total de células plasmáticas (CD138+), tanto en los nódulos linfáticos como el bazo, aumentó en todos los grupos de tratamiento en comparación con los ratones no infectados, y el tratamiento con anti-IgE/M1' no cambió de forma significativa la cantidad total de células plasmáticas en cualquiera de los dos órganos. Estos resultados demuestran la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para reducir los niveles de IgE en suero disminuyendo *in vivo* la cantidad de células que producen IgE.

Las **figuras 19A-G** ilustran la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para tratar terapéuticamente la respuesta tardía de la IgE en un ciclo de infección por *Nippostrongylus brasiliensis* ("NB"). La **figura 19A** es un esquema en que se muestra el diseño experimental con que los animales se trataron tres veces a la semana empezando el día 40. En la **figura 19B** se muestra que la producción máxima de IgE se obtuvo alrededor del día 15 y todos los anticuerpos anti-IgE/M1' redujeron la cantidad de IgE en suero. En las **figuras 19C-D** se muestra que el anticuerpo anti-IgE/M1' provoca una reducción significativa de los niveles de IgE tanto absolutos como normalizados, respectivamente, con relación al inicio del tratamiento. En las **figuras 19E-G** se muestra que el tratamiento con anti-IgE/M1' redujo significativamente los niveles de IgE en suero, en comparación con el isotipo de control anti-gp120 mIgG1, entre los días 48 y 55.

Descripción detallada de la forma de realización preferente

Todas las referencias mencionadas en la presente memoria descriptiva se incorporan específicamente a la misma a modo de referencia.

Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la técnica conocida. Estas técnicas se explican completamente en la bibliografía sobre la materia, como *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición (Sambrook *y col.*, 1989); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, editores, 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, editores, 1987); *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel *y col.*, editores, 1987, y actualizaciones periódicas); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *y col.*, editores, 1994); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (Perbal Bernard V., 1988); *Phage Display: A Laboratory Manual* (Barbas *y col.*, 2001).

Desarrollo y activación de linfocitos

Las dos clases principales de linfocitos en los seres humanos son T (derivados del timo) y B (derivados de la médula ósea). Estas células se derivan de células madre hematopoyéticas de la médula ósea y el hígado fetal que se han asignado a la vía de desarrollo linfoide. La progenie de estas células madre sigue vías divergentes para madurar en linfocitos B o T. El desarrollo de los linfocitos B humanos se produce por completo dentro de la médula ósea. Por otro lado, las células T se desarrollan a partir de precursores inmaduros que abandonan la médula y viajan a través del torrente sanguíneo hacia el timo, donde proliferan y se diferencian en linfocitos T maduros.

Los linfocitos maduros que emergen del timo o la médula ósea están en un estado inactivo, o de "descanso", es decir, son mitóticamente inactivos. Cuando se dispersan por el torrente sanguíneo, estos linfocitos "no tratados" o "vírgenes" viajan hacia diversos órganos linfoides secundarios o periféricos, como el bazo, los nódulos linfáticos o las amígdalas. La mayoría de los linfocitos

vírgenes tiene una esperanza de vida inherentemente corta y muere al cabo de pocos días después de abandonar la médula o el timo. Sin embargo, si una de estas células recibe señales que indiquen la presencia de un antígeno, puede activarse y experimentar sucesivas fases de división celular. Algunas de las células de la progenie resultante revierten entonces al estado de descanso para convertirse en *linfocitos B y T de memoria* que se ceban esencialmente para el próximo encuentro con el alérgeno estimulador. El resto de la progenie de linfocitos vírgenes activados con células efectoras, que sobreviven sólo durante unos días, pero realizan actividades defensivas específicas.

La activación de linfocitos se refiere a una serie ordenada de eventos a través de los cuales un linfocito en descanso pasa al estimularse a dividirse y producir progenie, convirtiéndose parte de ésta en células efectoras. Una respuesta completa incluye tanto la inducción de la proliferación celular (*mitogénesis*) como la expresión de funciones inmunológicas. Los linfocitos se activan cuando ligandos específicos se unen a receptores en sus superficies. Los ligandos son distintos para las células T y B, pero los mecanismos fisiológicos intracelulares son similares.

Los antígenos foráneos pueden por sí mismos inducir la activación de linfocitos, especialmente los antígenos poliméricos de gran tamaño que establecen enlaces cruzados en la superficie de las células B con inmunoglobulinas, u otras glicoproteínas en las células T. No obstante, la mayoría de los antígenos no es polimérica y ni siquiera al unirse directamente a las células B en grandes cantidades consigue inducir la activación. Estos antígenos más comunes activan las células B cuando se estimulan conjuntamente con linfocitos T auxiliares casi activados. Esta estimulación puede producirse a partir de linfocinas que las células T secretan, pero se transmite con mayor eficacia por contacto directo de las células B con proteínas en la superficie de las células T que interactúan con ciertos receptores en la superficie de las células B para generar una señal secundaria.

Células B

La característica que define a las células B es su capacidad para sintetizar inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas (Ig) son una familia de proteínas sumamente diversa compuesta de clases relacionadas de polipéptidos llamadas cadenas pesadas y cadenas ligeras. Cada Ig se une específicamente con un alto grado de afinidad a su propio antígeno específico. Las células B maduras pueden expresar inmunoglobulinas de dos formas diferentes, cada una de las cuales sirve para funciones exclusivas. En los linfocitos B en descanso (vírgenes o de memoria), las inmunoglobulinas se expresan únicamente en la superficie celular, donde actúan esencialmente como receptores unidos a la membrana de antígenos específicos. En contraste, las células B efectoras (células plasmáticas) secretan inmunoglobulinas en el entorno circundante. Estas inmunoglobulinas secretadas conservan la capacidad para reconocer y unirse (directamente a la forma unida a la membrana en las células B en descanso), y por lo general se hace referencia a ellas con el término "anticuerpo".

Cuando un linfocito B activado se divide, parte de su progenie se convierte en células B de memoria, mientras que el resto se diferencia en células plasmáticas. Dado que las células plasmáticas tienen una esperanza de vida relativamente corta, a menos que se produzcan nuevas, la población se extingue pronto y las inmunoglobulinas dejan de secretarse. Como resultado, la activación de células

B genera habitualmente una onda transitoria de proliferación, seguida de una ráfaga de secreción de anticuerpos que aumenta y después remite al cabo de varios días o unas pocas semanas. Las células B son la clase principal de células que participan en la inmunidad humoral, o el efecto protector mediado a través de los fluidos tisulares. Dado que los anticuerpos anti-IgE/M1' de la invención reducen realmente la cantidad de células B, incluyendo las de memoria, se pueden utilizar para "reiniciar" la memoria. Por tanto, el efecto de todo esto podría ser que el componente de células B que impulsa la respuesta alérgica en los individuos podría verse atenuado si no eliminado.

Células T

Los linfocitos T no expresan inmunoglobulinas, pero, por el contrario, detectan la presencia de sustancias foráneas mediante proteínas de superficie llamadas receptores de células T. Estos receptores reconocen a los antígenos bien por contacto directo o a través de su influencia en la actividad de otras células inmunes. Junto con los macrófagos, las células T son la clase principal de células que participan en la inmunidad con mediación celular.

A diferencia de las células B, las T pueden detectar sustancias foráneas sólo en contextos específicos. En particular, los linfocitos T reconocerán una proteína foránea sólo si primero se escinde en pequeños péptidos, que entonces se presentan en la superficie de una segunda célula anfitrión, llamada célula con presencia de antígeno (APC). Muchas clases de células anfitrión pueden presentar antígenos en algunas condiciones, pero ciertas clases se adaptan más específicamente a este propósito y son particularmente importantes a la hora de controlar la actividad de las células T, incluyendo macrófagos y otras células B. La presentación de antígenos depende en parte de proteínas específicas, llamadas proteínas complejas de histocompatibilidad principal (MHC), en la superficie de las células donde se produce la presentación. Por tanto, a fin de estimular la inmunidad con mediación celular, los péptidos foráneos deben presentarse a las células T en combinación con péptidos MHC, y un receptor de células T debe reconocer esta combinación.

Existen dos subgrupos importantes de células T: los linfocitos T citotóxicos (células T_c o CTL) y las células T auxiliares (T_H), que pueden identificarse aproximadamente sobre la base de la expresión en la superficie celular de los marcadores CD8 y CD4. Las células T son importantes en la defensa vírica y puede eliminar los virus directamente reconociendo ciertos péptidos víricos expresados en la superficie celular. Las células T_H promueven la proliferación, maduración y función inmunológica de otras clases de células, por ejemplo, la secreción de linfocinas para controlas las actividades de las células B, los macrófagos y las células T citotóxicas. Tanto los linfocitos T vírgenes como los de memoria permanecen habitualmente en el estado de descanso, sin exhibir una actividad auxiliar o citotóxica significativa. Cuando se activan, estas células pasan por varias fases de división mitótica para producir células hijas. Algunas de estas células hijas vuelven al estado de descanso como células de memoria, pero otras se convierten en células efectoras que expresan activamente una actividad auxiliar o citotóxica. Estas células hijas se comportan de forma similar a sus progenitores: las células CD4+ sólo pueden producir progenie CD4+, mientras que las células CD8+ únicamente generan progenie CD8+. Las células T efectoras expresan marcadores en la superficie celular que no se expresan en las células T en descanso, como CD25, CD28, CD29,

CD40L, los receptores de transferrina y las proteínas MHC de clase II. Cuando se retiran los estímulos activadores, la actividad citotóxica o auxiliar remite gradualmente a lo largo de un período de varios días mientras las células efectoras o bien mueren o vuelven al estado de descanso.

De forma similar a la activación de células B, las respuestas de los linfocitos T a la mayoría de los antígenos también requieren dos clases de estímulos simultáneos. El primero es el antígeno, que los receptores de células T pueden reconocer y unírsele si las proteínas MHC lo presentan apropiadamente en una célula con presencia de antígenos. Si bien este complejo antígeno-MHC envía una señal al interior de la célula, por lo general es insuficiente para resultar en la activación de las células T. La activación completa, como ocurre con las células T auxiliares, requiere la estimulación conjunta con otros ligandos específicos llamados coestimuladores, que se expresan en la superficie de la célula con presencia de antígenos. Por otra parte, la activación de una célula T citotóxica requiere habitualmente la acción de IL-2, una citocina que las células T auxiliares activadas secretan.

La respuesta inmune

Las tres propiedades funcionales principales del sistema inmunológico de los mamíferos que lo distinguen de las otras defensas del cuerpo son: (1) especificidad – la capacidad para reconocer y responder o no responder individualmente entre una enorme cantidad de moléculas objetivo, (2) discriminación – la capacidad para distinguir la presencia de ejemplares idénticos de otros ajenos a fin de coexistir pacíficamente con todas las innumerables proteínas y otros materiales orgánicos y al mismo tiempo seguir respondiendo enérgicamente al material foráneo introducido en el cuerpo, y (3) memoria – la capacidad de dejarse moldear por la experiencia de modo que los encuentros posteriores con un patógeno foráneo en particular provocarán una respuesta más rápida y contundente que la producida en el encuentro inicial. Debido a que los antagonistas de la IgE de la invención inducen la apoptosis de las células B que contienen IgE, se espera que atenúen o incluso borren la memoria inmune a antígenos en particular. También se espera que esto tenga un beneficio particular cuando la respuesta inmunológica enérgica a alérgenos comunes sea patológica, como es el caso de los trastornos atópicos.

Los linfocitos vírgenes se liberan continuamente desde los principales órganos linfoides hacia la periferia, llevando cada uno de ellos receptores en la superficie que permiten la unión a antígenos. La unión a antígenos en las células B se media a través de inmunoglobulinas unidas a la superficie, mientras que en las células T la mediación es a través de receptores de células T. Cuando los linfocitos vírgenes no están activados, mueren al cabo de pocos días después de haber entrado en la periferia. Aquéllos que sí se activan sobreviven y proliferan, produciendo células hijas que podrían entonces pasar por más ciclos de activación y proliferación. La velocidad e intensidad de la respuesta a un antígeno en concreto vienen determinadas en gran medida por la selección clonal: cuanto más numerosa sea la población de células hijas o clones específicos para un antígeno en particular, mayor será la cantidad de células que pueden reconocer y participar en la respuesta inmunológica. Cada respuesta inmunológica es una secuencia de eventos, compleja y de complicada regulación, en que intervienen varias clases de células. La respuesta se provoca cuando un *inmunogén* entra en el cuerpo y encuentra una clase especializada de células llamadas células con presencia de antígenos (APC).

Estas APC capturan una pequeña cantidad del inmunogén y la presentan de una forma que los linfocitos T auxiliares específicos para el antígeno pueden reconocerla. Las células T auxiliares pueden entonces activarse y, a su vez, promover la activación de otras clases de linfocitos, como las células B o las células T citotóxicas. Los linfocitos activados proliferan entonces y llevan a cabo sus funciones efectoras específicas. En cada etapa de este proceso, los linfocitos y las APC se comunican entre sí a través de un contacto directo o secretando citocinas reguladoras.

Los antígenos exógenos que una APC captura pasan por una serie de alteraciones denominadas *procesamiento del antígeno*. En este procesamiento, especialmente de inmunogenes proteináceos, se producen desnaturalizaciones y digestiones proteolíticas parciales, de modo que el inmunogén se escinde en péptidos cortos. Una cantidad limitada de los péptidos resultantes se asocia entonces de forma no covalente a proteínas MHC de clase II y se transporta a la superficie de APC, un proceso conocido como *presentación de antígenos*. Un linfocito T auxiliar CD4+ que entre en contacto directo con una APC puede activarse, pero sólo lo hará si expresa un proteína receptora de células T que pueda reconocer y unirse al complejo péptido-MHC particular que la APC presente.

Las células T auxiliares (T_H) son los orquestadores principales de la respuesta inmunológica porque son necesarias para la activación de las otras dos clases de células efectoras linfáticas: las células T citotóxicas (Tc) y las células plasmáticas que secretan anticuerpos. La activación de T_H se produce pronto en una respuesta inmunológica y requiere al menos dos señales. Una señal proviene de la unión del receptor de antígenos de células T al complejo antigénico péptido-MHC en la superficie de la APC que se trasmite a través del complejo proteínico CD3, mientras que la segunda, una señal coestimuladora a través de la APC, se cree que resulta de la unión de una proteína transmisora de señal separada en la superficie de las células T con un ligando específico en la APC. Una de estas interacciones conocidas es la de la proteína de células T CD28 con la familia de proteínas en la superficie de APC conocida como B7. Otros pares de proteínas de superficie también pueden mediar en la estimulación conjunta.

Unidas, las dos señales inducen a que la célula T auxiliar comience a secretar una citocina conocida como interleucina-2 (IL-2) y expresar también receptores de IL-2 específicos de alta afinidad en su superficie. La IL-2 es un factor mitogénico muy potente para los linfocitos T y resulta esencial para la respuesta de proliferación de las células T activadas. El efecto de IL-2 en la célula que la ha secretado es un fenómeno conocido como *efecto autocrino*. Se ha demostrado también que aun en caso de que una célula T haya recibido ambas señales, no proliferará si sus propios receptores de IL-2 en la superficie están bloqueados. La IL-2 también puede actuar en las células que se encuentren inmediatamente próximas, en un efecto denominado paracrino. Este efecto es especialmente importante para activar células T, lo cual por lo general no produce suficiente IL-2 para estimular su propia proliferación. Además de IL-2, las células T_H activadas secretan otras citocinas y promueven el crecimiento, la diferenciación y las funciones de las células B, los macrófagos y otras clases de células.

El contacto entre una APC y una célula T_H específica para un antígeno también tiene efectos en la APC – de los cuales, uno de los más importantes es la liberación de IL-1. Se cree que esta citocina actúa de forma autocrina para aumentar la expresión en la superficie de proteínas MHC de

clase II y diversas moléculas de adhesión reforzando por tanto la unión de la célula T_H y mejorando la presentación del antígeno. Al mismo tiempo, la IL-1 funciona de forma paracrina en la célula T_H para promover la secreción de IL-2 y la expresión de los receptores de IL-2.

Durante la activación de células T_H de la forma anteriormente descrita, algunas células B también pueden haber capturado el inmunogén a través de sus receptores de antígenos, que son formas unidas a membrana de los anticuerpos que más tarde secretarán. A diferencia de las células T, las células B reconocen a un inmunogén en su forma libre sin procesar. La unión específica a antígenos proporciona una clase de señal que puede llevar a la activación de células B. Una segunda clase de señal proviene de las células T_H activadas, que expresan proteínas que ayudan a activar la célula B uniéndose en su superficie a receptores que no son inmunoglobulinas. Estas señales derivadas de células T_H, que actúan en cualquier célula B independientemente de su especificidad para el antígeno, se conocen como factores auxiliares. Estos factores auxiliares incluyen IL-2, IL-4 e IL-6. Sin embargo, se consigue una ayuda más eficaz a través de un contacto célula-con-célula, que permite a las proteínas de la superficie de la célula T contactar directamente con las que están en la célula B. La forma más efectiva de ayuda mediada por contacto se produce cuando una proteína llamada ligando CD40 (CD40L), que se expresa en las células T_H sólo después de haberse activado, se une a una proteína llamada CD40 en las células B. En un proceso conocido como *activación presencial*, el contacto con una célula B activada puede incluso ser suficiente para activar las células B en descanso a pesar de que las inmunoglobulinas de su superficie no hayan contactado con el antígeno.

Los linfocitos Tc erradican las células que expresan antígenos foráneos en sus superficies, como las células anfitrión infectadas por virus. La mayoría de las células Tc expresa CD8 en lugar de CD4 y de ahí que reconoce a antígenos en asociación con proteínas MHC de clase I en lugar de clase II. Cuando un virus infecta a una célula somática, algunas proteínas víricas inmunogénicas pueden pasar por un procesamiento dentro de la célula, y los péptidos resultantes pueden entonces aparecer como complejos de superficie con moléculas MHC de clase I. A continuación, el receptor de células T de un clon específico para un antígeno puede reconocer estos complejos péptido-MHC, proporcionando así una de las dos señales necesarias para la activación de células Tc. La primera señal por sí sola induce receptores de IL-2 de alta afinidad en la célula Tc. La segunda señal proviene de la IL-2 que ha secretado un linfocito T_H activado cercano. Al recibir ambas señales, la célula Tc activada adquiere actividad citotóxica, lo cual le permite eliminar la célula a que está unida, así como cualquier otra célula que contenga los mismos complejos péptido-MHC de clase I. En algunos casos, esta eliminación se produce porque la célula Tc libera toxinas específicas en la célula objetivo; en otros, la célula Tc induce a la célula objetivo a suicidarse por apoptosis. La célula Tc activada también prolifera, originando células Tc adicionales con la misma especificidad para el antígeno.

La vía mediadora de IgE/mastocitos

Los anticuerpos de la IgE se unen en la superficie de mastocitos y basófilos, en la porción Fc de la molécula, a un receptor en la superficie celular de alta afinidad, llamado FcεRI. La reacción alérgica se inicia cuando la molécula alérgena polivalente se une a los anticuerpos que están

ocupando estos receptores. El resultado es la creación de un puente en el FcεRI, que por su lado señaliza a nivel intracelular causando la liberación y activación de mediadores de la inflamación: histamina, leucotrienos, factores quimiotácticos, factor de activación de plaquetas y proteinasas. Estos mediadores activados actúan localmente y aumentan la permeabilidad vascular, la vasodilatación, la contracción muscular suave y la secreción de la glándula mucosa. Dichos eventos se denominan en términos clínicos *fase inmediata* o *temprana*, y aparecen dentro de los primeros 15-30 minutos tras la exposición a un alérgeno. A lo largo de las 12 horas siguientes, células inflamatorias, procedentes de neutrófilos, eosinófilos y células mononucleares, se infiltran en el tejido de forma progresiva como respuesta a otros mediadores químicos cuya función todavía no se ha llegado a comprender por completo. Este período de 6-12 horas tras la exposición al alérgeno se designa como *fase tardía* y se caracteriza por manifestaciones clínicas de inflamación celular. Dado que estas reacciones de fase tardía, especialmente en el pulmón, se producen en ausencia de reacciones de fase temprana, aún no se ha llegado a comprender del todo si en ellas necesariamente media la IgE.

Este mecanismo es principalmente responsable de la anafilaxis, la urticaria y las enfermedades atópicas como la rinitis alérgica, el asma alérgica, la dermatitis atópica y la gastroenteropatía alérgica.

La vía efectora de linfocitos T/linfocinas

En ciertas enfermedades alérgicas media una reacción al alérgeno en que el linfocito T efector está sensibilizado al alérgeno específico como consecuencia de una exposición anterior. Al encontrar el alérgeno, las células T CD4+ se activan para generar linfocinas, lo cual resulta a lo largo de un período de varios días en la acumulación de un infiltrado de células mononucleares.

I. Definiciones

Un "*alérgeno*" o "*inmunogén*" es cualquier molécula capaz de provocar una respuesta inmunológica. Tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, el término cubre o bien la molécula antigénica en sí o su fuente de origen, como granos de polen, pelusa animal, veneno de insectos o productos alimenticios. Esto se contrasta con el término *antígeno*, que se refiere a una molécula que una inmunoglobulina o un receptor de células T puede reconocer de forma específica. Cualquier sustancia foránea capaz de inducir una respuesta inmunológica es un alérgeno en potencia. Se sabe que muchos productos químicos distintos de origen tanto natural como sintético son alergénicos. Es probable que los productos químicos orgánicos naturales complejos, especialmente las proteínas, causen una alergia en que medie un anticuerpo, mientras que los compuestos orgánicos simples, los productos químicos inorgánicos y los metales más preferentemente causan una alergia en que median células T. En algunos casos, el mismo alérgeno puede ser responsable de más de una clase de alergia. La exposición al alérgeno puede ser por inhalación, inyección o contacto dérmico.

El término "*anticuerpo*" incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos,

diacuerpos y moléculas de cadena simple), así como fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, Fab, $F(ab')_2$ y Fv). En la presente memoria descriptiva, los términos "*inmunoglobulina*" (Ig) y "*anticuerpo*" se utilizan indistintamente.

La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo de IgM consiste en 5 de las unidades básicas heterotetraméricas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, que contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos de IgA consisten en de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas, que pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas pesa generalmente unos 150.000 daltons. Cada cadena L se enlaza a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro según el isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena H tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α e γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N terminal un dominio variable (V_L) seguido de 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 algunos residuos concretos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las 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 (editores), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena ligera de cualquier especie de vertebrados puede asignarse a una de dos clases claramente distintas, denominadas kappa y lambda, sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas 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 la función de C_H, *por ejemplo*, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Un anticuerpo "*aislado*" es aquél 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). Preferentemente, el polipéptido aislado es libre de asociarse a todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, como los que resultan de células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y podrían incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En formas de realización preferentes, el polipéptido se purificará: (1) en más del 95% del peso del anticuerpo tal como se determina, por ejemplo, por el método de Lowry, y en algunas formas de realización, en más del 99% del peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos del

extremo N terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En cualquier caso, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará habitualmente mediante al menos un paso de purificación.

Por "*región variable*" o "*dominio variable*" de un anticuerpo se entiende los dominios amino terminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Se puede hacer referencia a los dominios variables de las cadenas pesada y ligera como "VH" y "VL", respectivamente. Estos dominios son por lo general las partes más variables del anticuerpo (con relación a otros anticuerpos de la misma clase) y contienen los sitios de unión al antígeno.

El término "*variable*" se refiere al hecho de que las secuencias de determinados segmentos de los dominios variables difieren enormemente entre los distintos anticuerpos. El dominio V media en la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a través de toda la extensión de los dominios variables. Por el contrario, se concentra en tres segmentos, denominados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la pesada. Las porciones más conservadas de los dominios variables se llaman regiones de estructura (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprende cuatro regiones FR que, en gran parte, adoptan una configuración de hoja-β, conectadas por tres HVR, que crean bucles que conectan la estructura de la hoja-β, y en algunos casos forman parte de ella. Las HVR de cada cadena se mantienen unidas y en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, junto con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *y col., Sequences of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "*anticuerpo monoclonal*" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, que los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos, excepto en posibles mutaciones de formación natural y/o modificaciones posteriores a la traducción (*por ejemplo*, isomerizaciones, amidaciones) que podrían estar presentes en cantidades insignificantes. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de ser sintetizados por el cultivo de hibridoma, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica que el anticuerpo se ha obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse que sea necesario producir el anticuerpo utilizando cualquier método concreto. Por

ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usen de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse a partir de diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método del hibridoma (*por ejemplo,* Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *y col., Hybridoma, 14 (3): 253-260* (1995), Harlow *y col., Antibodies: A Laboratory Manual,* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición, 1988); Hammerling *y col.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), los métodos del ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de EE.UU. nº 4.816.567), las tecnologías de presentación en fagos (véase, *por ejemplo*, Clackson *y col.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1992); Sidhu *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 338(2): 299-310 (2004); Lee *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *y col.*, *J. Immunol. Methods*, 284(1-2): 119-132(2004), y técnicas para producir anticuerpos humanos o semejantes a los humanos en animales que tienen parte o la totalidad de los loci o genes de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de la inmunoglobulina humana (véanse, *por ejemplo*, los documentos WO 1998/24893, WO 1996/34096, WO 1996/33735 y WO 1991/10741; Jakobovits *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *y col.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *y col.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. nºs 5.545.807, 5.545.806, 5.569.825, 5.625.126, 5.633.425 y 5.661.016; Marks *y col.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg *y col.*, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild *y col.*, *Nature Biotechnol.*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.*, 14: 826 (1996), y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

El término "*anticuerpo desnudo*" se refiere a un anticuerpo que no está conjugado con una porción citotóxica o un radiomarcador.

Los términos "*anticuerpo de longitud completa*", "*anticuerpo intacto*" o "*anticuerpo entero*" se usan indistintamente para hacer referencia a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, en contraposición a un fragmento de anticuerpo. En concreto, los anticuerpos enteros incluyen aquéllos con cadenas pesada y ligera, incluyendo una región Fc. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*por ejemplo*, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de la secuencia de aminoácidos de los mismos. En algunos casos, el anticuerpo intacto puede tener una o más funciones efectoras.

Un "*fragmento de anticuerpo*" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión al antígeno y/o variable de dicho anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos están los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, los diacuerpos, los anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. nº 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *y col.*, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 [1995]), las moléculas de anticuerpos de cadena única y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab está compuesto por una cadena L entera 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 por lo que respecta a la unión al antígeno,

es decir, tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ de gran tamaño que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlace disulfuro y distinta actividad de unión al antígeno y sigue siendo capaz de establecer un enlace cruzado con el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por tener algunos residuos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se da en la presente memoria descriptiva al Fab' en que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi terminal de ambas cadenas pesadas mantenidas unidas por los disulfuros. Las secuencias en la región Fc, que también es la parte que reconocen los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertas clases de células, determinan las funciones efectoras de los anticuerpos.

El "*Fv*" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Este fragmento está compuesto por un dímero del dominio de la región variable de una cadena pesada y otro de una cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (tres bucles de las cadenas H y L de cada uno de ellos) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un fragmento Fv que comprenda únicamente tres regiones HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

Los "*Fv de cadena única*", abreviados también como "*sFv*" o "*scFv*", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados a una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, volumen 113, Rosenburg and Moore, editores, Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

Los "*fragmentos funcionales*" de los anticuerpos de la invención comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que incluye generalmente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto o la región Fc de un anticuerpo que conserva o ha modificado su capacidad de unión a FcR. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

El término "*diacuerpos*" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (de entre 5 y 10 residuos) entre los dominios V_H and V_L de modo que se obtiene un emparejamiento de los dominios V entre cadenas pero no en el interior de éstas, dando lugar por tanto a un fragmento

bivalente, *es decir*, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen específicamente los anticuerpos "*quiméricos*" (inmunoglobulinas) en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras que las demás cadenas son idénticas u homólogas a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567 y Morrison *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria descriptiva incluyen anticuerpos PRIMATIZED® en que la región de unión al antígeno del anticuerpo se obtiene de un anticuerpo producido, *por ejemplo*, mediante la inmunización de monos macacos con un antígeno de interés. En la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo humanizado" se utiliza como un subgrupo de "anticuerpos quiméricos".

Las formas "*humanizadas*" de los anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En una forma de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región HVR del receptor se sustituyen por residuos procedentes de una región HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y/o capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región FR de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor ni el donante. Estas modificaciones se pueden llevar a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo, como la afinidad de unión. En general, un anticuerpo humanizado contendrá sustancialmente todos los dominios variables, al menos uno de ellos y típicamente dos, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una secuencia de inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de residuos FR individuales que mejoran el rendimiento del anticuerpo, como la afinidad de unión, la isomerización, la inmunogenicidad, *etc.* La cantidad de estas sustituciones de aminoácidos en las FR es por lo general no más de 6 en la cadena pesada y no más de 3 en la ligera. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véase, *por ejemplo*, Jones *y col.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Riechmann *y col.*, *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 EE.UU. n°s 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es aquél que contiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o que se ha producido utilizando cualquiera de las técnicas para producción de anticuerpos humanos divulgadas en la presente memoria descriptiva. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que contenga residuos de unión al antígeno no humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir utilizando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991), Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos también se dispone de los métodos descritos en Cole *y col.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *y col.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Los anticuerpos humanos pueden prepararse administrando el antígeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta al antígeno presentado, pero cuyos loci endógenos se hayan incapacitado, *por ejemplo*, xenorratones inmunizados (véanse, *por ejemplo*, las patentes de EE.UU. n°s 6.075.181 y 6.150.584 con relación a la tecnología XENOMOUSE^{TM}). Véase también, por ejemplo, Li *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con relación a los anticuerpos humanos generados mediante una tecnología del hibridoma de células B humanas.

En la presente memoria descriptiva, por "*región hipervariable*", "*HVR*" o "*HV*" se entiende las regiones de un dominio variable del anticuerpo que son hipervariables en su secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Por lo general, los anticuerpos contienen seis regiones hipervariables: tres en la VH (H1, H2, H3) y tres en la VL (L1, L2, L3). En anticuerpos nativos, H3 y L3 muestran la máxima diversidad de las seis regiones hipervariables y se cree que H3 en concreto desempeña un papel exclusivo a la hora de otorgar una buena especificidad a los anticuerpos. Véase, *por ejemplo*, Xu *y col.*, *Immunity,* 13:37-45 (2000) y Johnson y Wu en *Methods in Molecular Biology,* 248:1-25 (Lo, editores, Human Press, Totowa, NJ, 2003)). De hecho, los anticuerpos de camélidos que se producen naturalmente y están formados por una cadena pesada sólo son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, *por ejemplo*, Hamers-Casterman *y col.*, *Nature*, 363:446-448 (1993) y Sheriff *y col.*, *Nature Struct. Biol.*, 3:733-736 (1996).

En la presente memoria descriptiva, se usan y engloban diversas delineaciones de regiones hipervariables. Las regiones HVR que son regiones de determinación de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de las secuencias y son las que se usan con mayor frecuencia (Kabat y *col.*, *citado anteriormente*). Chothia, en cambio, se refiere a la ubicación de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de anticuerpos monoclonales representan una solución intermedia entre las regiones CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se emplean en el software de modelado de anticuerpos *monoclonales* (*AbM*) de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables "de contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles. Los residuos procedentes de cada una de estas regiones hipervariables se indican a continuación.

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

Las regiones hipervariables pueden comprender "HVR extendidas" como se indica a continuación: 24-36 ó 24-34 (L1), 46-56 ó 50-56 (L2) y 89-97 u 89-96 (L3) en la VL, y 26-35 (H1), 50-65 ó 47-65 (una forma de realización preferente) (H2), y 93-102 (H3) en la VH. Los residuos del dominio variable se numeran según Kabat *y col.*, *citado anteriormente*, para cada una de estas definiciones de HVR extendidas.

Los residuos de una "*estructura*" o "FR" son aquellos residuos de un dominio variable distintos de los residuos de una HVR, tal como se define en la presente memoria descriptiva.

La expresión "numeración de residuos de dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de los aminoácidos como en Kabat", y sus variaciones, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de las cadenas pesada o ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *y col.*, *citado anteriormente*. Utilizando este sistema de numeración, la secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que correspondan a un acortamiento de una FR o HVR del domino variable o una inserción en ellas, respectivamente. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una única inserción de aminoácidos (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (*por ejemplo*, residuos 82a, 82b y 82c, *etc.*, según Kabat) después del residuo 82 de la FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos puede determinarse para un anticuerpo dado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.

A efectos de la presente memoria descriptiva, una "*estructura humana del aceptor*" es una estructura que comprende la secuencia aminoacídica de una estructura de V_L o V_H derivada de una estructura de inmunoglobulinas humanas o de consenso humana. Una estructura humana del aceptor "derivada de" una estructura de inmunoglobulinas humanas o de consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de éstas o puede contener cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos. En algunas formas de realización, la cantidad de cambios preexistentes en la secuencia de aminoácidos es 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.

Una "*estructura de consenso humana*" es una estructura que representa los residuos de aminoácidos más frecuentes en una selección de secuencias de estructuras de V_L o V_H de inmunoglobulina humana. Por lo general, la selección de secuencias de V_L o V_H de inmunoglobulina humana se realiza en un subgrupo de secuencias de dominio variable. Por lo general también, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat *y col.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda,

MD (1991). En una forma de realización, para V_L, el subgrupo es un subgrupo kappa I como en Kabat *y col.*, *citado anteriormente*. En una forma de realización, para V_H, el subgrupo es un subgrupo III como en Kabat *y col.*, *citado anteriormente*.

Una "*estructura de consenso del subgrupo III de V_H*" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III variable pesado de Kabat *y col.*, *citado anteriormente*. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo III de V_H comprende al menos una parte, o la totalidad, de cada una de las siguientes secuencias: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (identificador de secuencia nº 55) (H1), WVRQAPGKGLEWVA (identificador de secuencia nº 56) (H2), RFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (identificador de secuencia nº 57) (H3), WGQGTLVTVSS (identificador de secuencia nº 58) (H4).

Una "*estructura de consenso del subgrupo I de V_L*" comprende la secuencia de consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa variable ligero de Kabat *y col.*, *citado anteriormente*. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la estructura de consenso del subgrupo I de V_H comprende al menos una parte, o la totalidad, de cada una de las siguientes secuencias: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (identificador de secuencia nº 59) (L1), WYQQKPGKAPKLLIY (identificador de secuencia nº 60) (L2), GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (identificador de secuencia nº 61) (L3), FGQGTKVEIKR (identificador de secuencia nº 62) (L4).

Una "*modificación aminoacídica*" en una posición especificada, *por ejemplo*, de la región Fc, hace referencia a la sustitución o supresión del residuo especificado, o la inserción de al menos un residuo aminoacídico adyacente al residuo especificado. Por inserción "adyacente" a un residuo especificado se entiende la inserción dentro de uno a dos residuos del mismo. La inserción puede estar en el extremo N terminal o C terminal del residuo especificado. La modificación aminoacídica preferente en la presente memoria descriptiva es una sustitución.

Un anticuerpo con "*maduración de afinidad*" es aquél con una o más alteraciones en una o más HVR del mismo que dan lugar a una mejora de la afinidad del anticuerpo al antígeno, en comparación con un anticuerpo original que no incluye dicha(s) alteración(es). En una forma de realización, un anticuerpo con maduración de afinidad presenta afinidades nanomolares e incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos con maduración de afinidad se producen mediante procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, en Marks *y col.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992), se describe la maduración de afinidad a través de la transposición de los dominios V_H y V_L. La mutagénesis aleatoria de los residuos de una HVR y/o una región de estructura se describen, por ejemplo, en: Barbas *y col.*, *Proc Nat. Acad. Sci USA*, 91:3809-3813 (1994), Schier *y col.*, *Gene*, 169:147-155 (1995), Yelton *y col.*, *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995), Jackson *y col.*, *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995) y Hawkins *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo que "*se una específicamente a*" o sea "*específico para*" un polipéptido en particular o un epítopo en un polipéptido en particular es aquél que se une a dicho polipéptido en particular o epítopo en un polipéptido en particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro

polipéptido o epítopo de polipéptido. Por ejemplo, los anticuerpos específicos para M1' de la presente invención son específicos para el segmento extracelular de M1' de la IgE hallada en IgE unida en células B, pero que no está presente en IgE secretada.

Un anticuerpo "*de bloqueo*" o "*antagonista*" es aquél que inhibe o reduce una actividad biológica del antígeno al que se une. En algunas formas de realización, los anticuerpos de bloqueo o antagonistas inhiben sustancial o completamente la actividad biológica del antígeno. Los anticuerpos anti-IgE apoptóticos de la invención bloquean la actividad mediadora de la IgE en la respuesta inmunológica de una forma para reducir el nivel de IgE en suero tanto libre como total.

Los anticuerpos que "*inducen la apoptosis*" o son "*apoptóticos*" son aquéllos que inducen la muerte celular programada tal como se determina en los ensayos estándar de apoptosis, como la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción celular, la dilatación del retículo endoplasmático, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). Por ejemplo, la actividad apoptótica de los anticuerpos anti-IgE de la presente invención puede mostrarse tiñendo células con IgE unida a la superficie con anexina V.

El término "*IgE en suero total*" se refiere a la cantidad total de IgE presente en una muestra, incluyendo la libre o no ligada, así como la IgE que forma complejos con una molécula de enlace (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-IgE o una célula B que porte IgE). Por "*IgE en suero libre*" se entiende la IgE que no está ligada a una molécula de enlace.

El término "*IgE específica para el alérgeno*" se refiere a la IgE que es específica para un antígeno en particular, como resultado de una exposición inicial al alérgeno en un proceso conocido como sensibilización a la alergia, y se une a la superficie de mastocitos y basófilos, pudiendo activarlos ante una exposición posterior al mismo alérgeno. Varios factores mitogénicos de virus (por ejemplo, citomegalovirus – CMV), bacterias (por ejemplo, *Staphylococcus*), helmintos (por ejemplo, *Ascaris, Schistosoma*) y factores adyuvantes en la polución del aire (por ejemplo, el humo del tabaco y los gases de combustión del gasóleo) estimulan la producción de moléculas de IgE sin iniciar cualquier sensibilización a IgE específica para el alérgeno. Por tanto, debido a que los niveles de IgE pueden elevarse de una forma que no predisponga necesariamente al anfitrión a ser más susceptible a un trastorno donde medie la IgE, los niveles de IgE específica para el alérgeno se utilizan a veces en las evaluaciones clínicas.

El término "*reducir específicamente las células B que producen IgE*" hace referencia a la capacidad para reducir de forma específica la población o eficacia de las células B que secretan específicamente IgE (*es decir*, las células plasmáticas) pero no afectan significativamente a la población o eficacia de las células B que secretan otras inmunoglobulinas, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM.

El término "*fase sólida*" describe una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas englobadas en la presente memoria descriptiva se incluyen aquéllas formadas parcial o completamente por cristal (*por ejemplo*, cristal poroso controlado), polisacáridos (*por ejemplo*, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol de polivinilo y siliconas. En ciertas formas de realización, según el contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (*por*

ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente de EE.UU. nº 4.275.149.

Las "*funciones efectoras*" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (la región Fc de una secuencia nativa o de una variante de una secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían según el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complementos, la unión a receptores de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (*por ejemplo*, los receptores de células B) y la activación de las células B.

La "*citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos*" o *ADCC* se refiere a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada y unida a los receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (*por ejemplo*, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan de forma específica a una célula objetivo que porte un antígeno y, posteriormente, la destruyan con citotoxinas. Los anticuerpos "activan" las células citotóxicas y son necesarios para destruir la célula diana mediante este mecanismo. Las células principales para mediar en la ADCC, las células asesinas naturales (NK), sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del 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). A fin de evaluar la actividad de la ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, como el que se describe en las patentes de EE.UU. n°s 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se encuentran las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de la ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, *por ejemplo*, en un modelo animal como el divulgado en Clynes *y col.*, *PNAS USA*, 95:652-656 (1998).

A menos que se indique lo contrario en la presente memoria descriptiva, la numeración de los residuos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU como en Kabat *y col.*, *citado anteriormente*. Por "índice EU como en Kabat" se entiende la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

En la presente memoria descriptiva, el término "*región Fc*" se utiliza para definir una región C terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo las regiones Fc de secuencia nativa y las variantes de las regiones Fc. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se suele definir como la extensión que va desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxil terminal del mismo. La lisina en el extremo C terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la producción o purificación del anticuerpo, o generando mediante recombinación el ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo. Por consiguiente, una composición de anticuerpos intactos puede comprender poblaciones de anticuerpos con todos los residuos K447 eliminados, poblaciones de anticuerpos sin residuos K447 eliminados y poblaciones de anticuerpos con una mezcla de

anticuerpos con y sin el residuo K447. Las regiones Fc de secuencia nativa aptas para utilizar en los anticuerpos de la invención incluyen las regiones IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas.

Los términos "*receptor de Fc*" o "*FcR*" describen un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo sus variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas; los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (Véase M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9: 457-92 (1991), Capel *y col.*, *Immunomethods*, 4: 25-34 (1994) y de Haas *y col.*, *J. Lab. Clin. Med.*, 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluidos aquéllos que se identifiquen en el futuro, se engloban en el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva.

El término "*receptor de Fc*" o "*FcR*" también incluye el receptor neonatal, *FcRn*, que es responsable de transferir las IgG maternas al feto. Guyer *y col.*, *J. Immunol.*, 117: 587 (1976) y Kim *y col.*, *J. Immunol.*, 24: 249 (1994). Se conocen los métodos de medición de la unión al FcRn (véase, *por ejemplo*, Ghetie y Ward, *Immunol. Today*, 18: (12): 592-8 (1997), Ghetie *y col.*, *Nature Biotechnology*, 15 (7): 637-40 (1997), Hinton *y col.*, *J. Biol. Chem.*, 279 (8): 6213-6 (2004) y el documento WO 2004/92219 (Hinton *y col.*).

La unión al FcRn in vivo y la semivida sérica de los polipéptidos de unión al FcRn humano de alta afinidad pueden analizarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan el FcRn humano, o en primates a los que se administran polipéptidos con una variante de la región Fc. En el documento WO 2004/42072 (Presta) se describen variantes de anticuerpos con capacidad de unión a los FcR mejorada o disminuida. Véase también, *por ejemplo*, Shields *y col.*, *J. Biol. Chem.*, 9(2): 6591-6604 (2001).

Las "*células efectoras humanas*" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, siendo las PBMC y las NK las células preferentes. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, *por ejemplo*, la sangre.

La "*citotoxicidad dependiente de complementos*" o "*CDC*" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, *por ejemplo*, tal como se describe en Gazzano-Santoro *y col.*, J. *Immunol. Methods*, 202: 163 (1996).

Las variantes polipeptídicas con secuencias aminoacídicas de la región Fc alteradas y capacidad de unión a Cq1 aumentada o disminuida se describen en la patente de EE.UU. nº 6.194.551B1 y el documento WO99/51642. El contenido de dichas publicaciones de patentes se incorpora específicamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Véase, también, Idusogie *y col.*, *J. Immunol.*, 164: 4178-4184 (2000).

El sitio de N-glicosilación en IgG está en Asn297, en el dominio CH2. La presente invención también proporciona composiciones de un anticuerpo humanizado que se une a CD20 y tiene una región Fc, en la que aproximadamente el 80-100% (y preferentemente el 90-99%) del anticuerpo de la composición comprende una estructura con un carbohidrato de núcleo maduro que carece de fucosa, unido a la región Fc de la glicoproteína. En la presente memoria descriptiva se demostró que dichas composiciones mostraban una sorprendente mejora de la unión a Fc(RIIIA (F158), que no es tan eficaz como Fc(RIIIA (V158) a la hora de interactuar con la IgG humana. Por tanto, se prevé que las composiciones de la presente memoria descriptiva sean superiores a las composiciones de anticuerpos anti-CD20 anteriormente descritas, en especial para la terapia de pacientes humanos que expresen Fc(RIIIA (F158). Fc(RIIIA (F158) es más común que Fc(RIIIA (V158) en sujetos afroamericanos y caucásicos sanos normales. Véase Lehrnbecher *y col.*, *Blood*, 94:4220 (1999). La presente solicitud demuestra también el aumento sinérgico de la unión a Fc(RIII y/o la función de ADCC que resulta de combinar las variaciones de glicosilación de la presente memoria descriptiva con modificaciones de secuencias de aminoácidos en la región Fc de la glicoproteína.

Por "*afinidad de unión*" se entiende generalmente la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (*por ejemplo*, un anticuerpo) y su molécula de enlace (*por ejemplo*, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, por "afinidad de unión" se entiende la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (*por ejemplo*, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X a su molécula de enlace Y se puede representar por lo general mediante la constante de disociación (*Kd*). La afinidad se puede medir mediante métodos habituales conocidos en la especialidad, incluyendo los descritos en la presente memoria descriptiva. Los anticuerpos con baja afinidad se suelen unir al antígeno lentamente y tienden a disociarse de inmediato, mientras que los anticuerpos con alta afinidad se unen al antígeno más rápidamente, por lo general, y suelen permanecer unidos más tiempo. Son diversos los métodos para medir la afinidad de unión conocidos en la materia y cualquier de ellos se puede utilizar para los fines de la presente invención. A continuación se describen formas de realización específicas a modo de ilustración y ejemplo para medir la afinidad de unión.

En una forma de realización, la "*Kd*" o el "*valor Kd*" según esta invención se mide mediante un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno, como se describe en el siguiente ensayo. La afinidad de unión en solución de los Fab al antígeno se mide equilibrando los Fab con una concentración mínima del antígeno marcado con (^{125}I) en presencia de una serie de titulación de antígeno no marcado y, luego, capturando el antígeno unido con una placa revestida de anticuerpos anti-Fab (véase, *por ejemplo*, Chen *y col.*, *J. Mol Biol.*, 293:865-881 (1999)). Para establecer las condiciones del ensayo, las placas

de microtitulación (DYNEX Technologies, Inc.) se recubren durante toda una noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en 50 mM de carbonato sódico (pH 9,6) y, a continuación, se bloquean con un 2% (p/v) de albúmina sérica bovina en PBS entre dos y cinco horas a temperatura ambiente (23 °C aproximadamente). En una placa no adsorbente (Nunc nº 269620), se mezclan 100 pM o 26 pM de antígeno marcado con [^{125}I] con diluciones seriadas de un Fab de interés (*por ejemplo*, que concuerde con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta *y col.*, *Cancer Res.*, 57:4593-4599 (1997)). A continuación, el Fab de interés se incuba durante toda la noche; no obstante, la incubación puede continuar durante más tiempo (*por ejemplo*, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para su incubación a temperatura ambiente (*por ejemplo*, durante una hora). Luego, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con surfactante TWEEN-20™ al 0,1% en PBS. Una vez secas las placas, se añaden 150 µl/pocillo de centellador (MICROSCINT-20™; Packard), y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen concentraciones de cada Fab que proporcionen un 20%, o un porcentaje inferior, de unión máxima para utilizarlas en ensayos de unión competitivos.

Según otra forma de realización, la *Kd* se mide con análisis de resonancia plasmón de superficie en que se emplea un instrumento BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En resumen, los chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) se activan con clorhidrato de *N*-etil-*N'*- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS), según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con 10 mM de acetato sódico, pH 4,8, en 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 µl/minuto a fin de conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína emparejada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta 1 M de etanolamina para bloquear grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyecta el doble de diluciones seriadas de Fab (de 0,78 a 500 nM) en PBS con surfactante TWEEN 20™ (PBST) al 0,05% a 25 °C a un caudal de 25 µl/minuto aproximadamente. Las tasas de asociación (k_{on}) y disociación (k_{off}) se calculan mediante un sencillo modelo de unión uno-a-uno de Langmuir (BIAcore® Evaluation Software, versión 3.2) encajando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como el cociente k_{off}/k_{on}. Véase, *por ejemplo*, Chen *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 293:865-881 (1999). Si la tasa de asociación excede de 10^6 M^{-1} s^{-1} según el ensayo de resonancia plasmón de superficie mencionado anteriormente, entonces se puede determinar utilizando una técnica de absorción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de la emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm, emisión = 340 nm, 16 nm de frecuencia) a 25 °C de 20 nM de un anticuerpo anti-antígeno (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones cada vez más elevadas de antígeno según medición en un espectrómetro, como un espectrofotómetro equipado con un módulo "stop-flow" (interruptor de flujo) (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) provisto de una cubeta con agitador.

También se puede determinar una "*tasa de asociación*" o "k_{on}" según esta invención tal como se describe anteriormente, utilizando un sistema BIACORE®-2000 o BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

La expresión "*sustancialmente reducido(a)*" o "*sustancialmente diferente*", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, denota un grado suficientemente elevado de diferencia entre dos valores numéricos (por lo general, uno asociado a una molécula y el otro a una molécula de referencia/comparadora), de forma que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una importancia estadística dentro del contexto de la característica biológica que dichos valores miden (*por ejemplo*, valores Kd). La diferencia entre estos dos valores es, por ejemplo, superior al 10% aproximadamente, al 20% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 40% aproximadamente y/o al 50% aproximadamente como función del valor de la molécula de referencia/comparadora.

El término "*sustancialmente similar*" o "*sustancialmente el/la mismo(a)*", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, denota un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (por ejemplo, uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro a un anticuerpo de referencia/comparador), de forma que un experto en la materia consideraría la diferencia entre los dos valores de escasa o nula importancia estadística y/o biológica dentro del contexto de la característica biológica que dichos valores miden (*por ejemplo*, valores Kd). La diferencia entre estos dos valores es, por ejemplo, inferior al 50% aproximadamente, al 40% aproximadamente, al 30% aproximadamente, al 20% aproximadamente y/o al 10% aproximadamente como función del valor de referencia/comparador.

El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" y la "homología" con relación a una secuencia de péptidos, polipéptidos o anticuerpos se definen como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica específica, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, sin considerar sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que se conocen en la materia, por ejemplo, usar algún software informático comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en este campo pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. A efectos de la presente memoria descriptiva, sin embargo, los valores porcentuales de identidad de las secuencias de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, de Genentech, Inc. El código fuente de ALIGN-2 se ha presentado junto con documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office (Oficina de derechos de autor de EE.UU.), Washington D.C., 20559, donde ha quedado inscrito con el nº TXU510087 del Registro de derechos de autor de EE.UU. Genentech, Inc., South San Francisco, California, es la empresa que comercializa el programa ALIGN-2. Este programa debería

compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias y no varían.

En situaciones que se emplee ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A con relación a una determinada secuencia de aminoácidos B (lo que también se puede expresar alternativamente diciendo que una determinada secuencia de aminoácidos A tiene o presenta un porcentaje concreto de identidad de la secuencia de aminoácidos con relación a una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos que el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 contabiliza como coincidencias idénticas en la alineación de A y B que establece, y donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se observará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la de la B, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos A con relación a B no será igual que el de B con relación a A.

A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores porcentuales de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

Una molécula de ácidos nucleicos "*aislados*" que codifica los anticuerpos de la presente memoria descriptiva es una molécula de ácidos nucleicos que se identifica y separa de, al menos, una molécula contaminante de ácidos nucleicos con la que se asocia habitualmente en el entorno donde se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado es libre de asociarse a todos los demás componentes de su entorno de producción. Las moléculas de ácidos nucleicos aislados que codifican los polipéptidos y anticuerpos de la presente memoria descriptiva se presentan de una forma distinta a la forma o configuración en que se encuentran en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos aislados se distinguen de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y anticuerpos de la presente memoria descriptiva y existen de forma natural en las células.

Por "*secuencias de control*" se entienden las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora enlazada de forma funcional a un organismo anfitrión en particular. Las secuencias de control que son aptas para células procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operadores y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "*enlazado de forma funcional*" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una secuencia previa o un líder secretor está enlazado de forma funcional al ADN de un polipéptido si se expresa como una proteína previa que participa en la secreción del polipéptido, un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia o un sitio de unión al ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificadora si está situado de forma tal que facilite la traducción. Por lo general, por "enlazado de forma funcional" se entiende que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. El

enlace se consigue mediante el ligado en sitios de restricción apropiados. Si esos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica habitual.

El término "*señalizado con epítopo*", cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un polipéptido quimérico que contiene un polipéptido o anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva fusionado a un "polipéptido señalizado". El polipéptido señalizado tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual se pueda elaborar un anticuerpo, pero es suficientemente corto para no interferir en la actividad del polipéptido al cual se fusiona. Preferentemente, el polipéptido señalizado es también bastante exclusivo, de forma que el anticuerpo no tenga una reacción cruzada sustancial con otros epítopos. Por lo general, los polipéptidos señalizados aptos tienen al menos 6 residuos de aminoácidos, siendo la cantidad habitual entre 8 y 50 (preferentemente, entre 10 y 20).

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "*inmunoadhesina*" designa moléculas parecidas a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesión") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos que tenga la especificidad de unión deseada, y no sea el sitio de reconocimiento y unión al antígeno de un anticuerpo (*es decir*, que sea "heteróloga"), con una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La porción de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es, generalmente, una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, como por ejemplo las subclases IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en la presente memoria descriptiva en el lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra CH_2 y CH_3 o las regiones bisagra CH_1, CH_2 y CH_3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 publicada el 27 de junio de 1995. Por ejemplo, las inmunoadhesinas útiles como segundos medicamentos adecuados para una terapia de combinación incluyen en la presente memoria descriptiva polipéptidos que comprenden las porciones de unión a BLyS de un receptor de BLyS sin que la transmembrana de BR3, TACI o BCMA se fusione con un dominio constante de una secuencia de inmunoglobulina.

Por "*proteína de fusión*" y "*polipéptido de fusión*" se entiende un polipéptido con dos porciones covalentemente enlazadas, donde cada una de ellas es un polipéptido con una propiedad diferente. Esta propiedad puede ser biológica, como la actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad puede ser también una simple propiedad física o química, como la unión a una molécula objetivo, la catálisis de una reacción, *etc*. Las dos porciones pueden enlazarse directamente mediante un único puente peptídico o a través de un enlazador peptídico que estarán entre sí en una estructura de lectura.

Una formulación "*estable*" es aquélla en que la proteína que forme parte de la misma conserva esencialmente su estabilidad e integridad físicas y químicas al almacenarse. Existen en la materia diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas, que se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery,* 247-301, Vincent Lee Editores, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Publicadores (1991) y Jones, A., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 10: 29-90 (1993). La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Para una examinación rápida, la formulación puede almacenarse a 40 °C entre 2 semanas y 1 mes, momento en que se medirá la estabilidad. Cuando la formulación deba almacenarse a 2-8 °C, por lo general debería ser estable a 30 ó 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a 2-8 °C durante al menos 2 años. Cuando la formulación deba almacenarse a 30 °C, por lo general debería ser estable durante al menos 2 años a 30 °C y/o estable a 40 °C durante al menos 6 meses. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento puede emplearse como indicador de la estabilidad de la proteína. Por tanto, una formulación "estable" puede ser aquélla en que menos de aproximadamente un 10% y preferentemente menos de aproximadamente un 5% de la proteína esté presente en la formulación como agregado. En otras formas de realización, puede determinarse cualquier aumento de la formación de agregados durante el almacenamiento de la formulación.

Una formulación "*reconstituida*" es aquélla que se ha preparado disolviendo una proteína liofilizada o una formulación de anticuerpos en un diluyente de modo que la proteína se disperse a través de la misma. La formulación reconstituida es apta para administrarla (por ejemplo, por vía parenteral) a un paciente para tratarlo con la proteína de interés y, en ciertas formas de realización de la invención, puede ser una que sea apta para la administración subcutánea.

Una formulación "*isotónica*" es aquélla que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán por lo general una presión osmótica de entre 250 y 350 mOsm. El término "hipotónica" describe una formulación con una presión osmótica inferior a la de la sangre humana. De forma equivalente, el término "hipertónica" se utiliza para describir una formulación con una presión osmótica superior a la de la sangre humana. La isotonicidad puede medirse mediante un osmómetro de presión de vapor o congelación, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o un tampón.

El término "*vehículos*", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, incluye vehículos, excipientes o estabilizadores con cualidades farmacéuticas aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo con cualidades fisiológicas aceptables es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de vehículos con cualidades fisiológicas aceptables están tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos), proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas, polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes como EDTA, alcoholes azucarados, como manitol o

sorbitol, contraiones formadores de sales, como sodio y/o surfactantes no iónicos, como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

Por "*prospecto*" se entiende las instrucciones que habitualmente se incluyen en los envases comerciales de los fármacos y contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones, otros medicamentos que pueden combinarse con el producto envasado y/o advertencias relativas al uso de dichos medicamentos, *etc.*

Un "*ácido con cualidades farmacéuticas aceptables*" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no sean tóxicos en la concentración y el modo que se formularon. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos aptos incluyen hidroclórico, perclórico, hidrobrómico, hidroyódico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, *etc.* Los ácidos orgánicos aptos incluyen alquilos de cadena recta y ramificada, aromáticos, cíclicos, cicloalifáticos, arilalifáticos, heterocíclicos, saturados, insaturados, mono-, di- y tri-carboxílicos, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, *t*-butil acético, antranílico, propanoico, 2-hidroxipropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentano propiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, eftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-corobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, *p*-toluenosulfónico, canforsulfónico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-ene-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenobis-3-(hidroxi-2-ene-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

Las "*bases con cualidades farmacéuticas aceptables*" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no sean tóxicas en la concentración y el modo que se formularon. Por ejemplo, las bases aptas incluyen las formadas a partir de una base inorgánica que forme metales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfolina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas como aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones [*por ejemplo*, $N(R')_4^+$ (donde R' es independientemente un alquilo H o C_{1-4}, *por ejemplo*, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, diciclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilenodiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperacina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y sustancias parecidas. Las bases orgánicas no tóxicas particularmente preferentes son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, diciclohexilamina, colina y cafeína.

Otros ácidos y bases adicionales con cualidades farmacéuticas aceptables que se pueden utilizar en la presente invención incluyen los derivados de aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparragina.

Los tampones y las sales "*con cualidades farmacéuticas aceptables*" incluyen los derivados de sales de adición tanto de ácidos como bases de los ácidos y las bases anteriormente indicados. Los tampones y/o las sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "*azúcar con cualidades farmacéuticas aceptables*" es una molécula que, al combinarse con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína al almacenarla. Cuando la formulación se ha diseñado para liofilizarse y después reconstituirse, los "azúcares con cualidades farmacéuticas aceptables" también se pueden conocer como un "lioprotector". Ejemplos de estos azúcares y sus correspondientes alcoholes azucarados incluyen: un aminoácido como glutamato monosódico o histidina, una metilamina como betaína, una sal liotrópica como sulfato de magnesio, un poliol como trihídrico o alcoholes azucarados de peso molecular superior, *por ejemplo*, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol, propilenglicol, polietilenglicol, PLURONICS® y combinaciones de los mismos. Otros ejemplos adicionales de lioprotectores incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Ejemplos de azúcares reductores son glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores son los glicósidos no reductores de compuestos de polihidroxi seleccionados de alcoholes azucarados y otros polialcoholes de cadena recta. Los alcoholes azucarados preferentes son monoglicósidos, especialmente aquellos compuestos obtenidos por reducción de disacáridos como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo de la parte glicosídica puede ser o bien glucosídico o galactosídico. Ejemplos adicionales de alcoholes azucarados son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los azúcares con cualidades farmacéuticas aceptables preferentes son los azúcares no reductores trehalosa o sacarosa. Los azúcares con cualidades farmacéuticas aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad protectora" (*por ejemplo*, una liofilización previa), lo cual significa que la proteína esencialmente conserva su estabilidad e integridad físicas y químicas durante el almacenamiento (*por ejemplo*, después de la reconstitución y el almacenamiento).

El "*diluyente*" de interés en la presente memoria descriptiva es aquél que tiene cualidades farmacéuticas aceptables (es seguro y no tóxico para la administración a seres humanos) y es útil para preparar una formulación líquida, como una formulación reconstituida después de la liofilización. Ejemplos de diluyentes son agua esterilizada, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución con pH tamponado (*por ejemplo*, una solución salina con tampón fosfatado), una solución salina esterilizada, una solución de Ringer o una solución de dextrosa. En una forma de realización alternativa, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un "*preservativo*" es un compuesto que puede añadirse a las formulaciones de la presente memoria descriptiva para reducir la actividad bacteriana. La adición de un preservativo puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación multiusos (múltiples dosis). Entre los ejemplos de preservativos potenciales están cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otras clases de preservativos incluyen alcoholes aromáticos como fenol, butil y bencil alcohol, parabenos alquilo como metil o

propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol. El preservativo más preferente en la presente memoria descriptiva es bencil alcohol.

Por "*tratamiento*" se entiende una intervención clínica pensada para alterar la evolución natural de la célula o el sujeto tratado, y se puede realizar como prevención o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen prevenir la aparición o recurrencia de una enfermedad, prevenir la metástasis, disminuir la tasa de la progresión de una enfermedad, aliviar o paliar el estado de una enfermedad y la remisión o la mejora de la prognosis. En algunas formas de realización, los anticuerpos de la invención se usan para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno. Un sujeto se "trata" satisfactoriamente, por ejemplo, usando los anticuerpos anti-IgE apoptóticos de la invención, si se mitigan uno o más síntomas asociados a un trastorno donde medie la IgE.

Una "*cantidad eficaz*" se refiere al menos a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el efecto deseado o indicado, incluyendo un resultado terapéutico o profiláctico.

Una "*cantidad terapéuticamente eficaz*" es al menos la concentración mínima requerida para lograr una mejora medible o la prevención de un trastorno en particular. Una cantidad terapéuticamente eficaz en la presente memoria descriptiva puede variar según factores como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del paciente y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquélla en que los efectos terapéuticamente beneficiosos contrarrestan cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo. Una "*cantidad eficaz desde un punto de vista profiláctico*" es una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el efecto profiláctico deseado. Por lo general, aunque no necesariamente, dado que una dosis profiláctica se utiliza en sujetos antes de la enfermedad o en una etapa temprana, la cantidad eficaz desde un punto de vista profiláctico puede ser inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

Por administración "*crónica*" se entiende la administración del fármaco o fármacos de un modo continuo, en contraposición a un modo agudo, a fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

A efectos del tratamiento, "*mamífero*" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos, de granja y utilizados en zoológicos, actividades deportivas o de compañía, como perros, caballos, conejos, ganado vacuno, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, *etc*. Preferentemente, el mamífero es un humano.

Por "*formulación farmacéutica*" se entiende una preparación que, por sus características, permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto a quien se le administraría la formulación. Estas formulaciones están esterilizadas.

Una formulación "*esterilizada*" es aséptica o libre de cualquier microorganismo vivo y sus esporas.

El término "*aproximadamente*", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, hace referencia al rango de error habitual para el valor de que se trate, conocido fácilmente por el técnico en la materia.

Un "*antihistamínico*", tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, es un agente que antagoniza el efecto fisiológico de la histamina. La unión de la histamina a sus receptores, H_1 and H_2, resulta en los característicos síntomas y efectos alérgicos de picazón, enrojecimiento, hinchazón, *etc*. Muchos antihistamínicos actúan bloqueando la unión de la histamina a sus receptores H1, H2; no obstante, se cree que otros funcionan inhibiendo la liberación de histamina. Ejemplos de antihistamínicos son clorfeniramina, difenhidramina, prometacina, cromolina sódica, astemizola, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, hidrocloruro de cetiricina, fumarato de clemastina, hidrocloruro de ciproheptadina, maleato de dexbronfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, hidrocloruro de difenhidramina, succinato de doxilamina, hidrocloruro de fexofendadina, hidrocloruro de terfenadina, hidrocloruro de hidroxicina, loratidina, hidrocloruro de meclicina, citrato de tripelanamina, hidrocloruro de tripelanamina, hidrocloruro de triprolidina.

Un "*broncodilatador*", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, describe a agentes que antagonizan o broncoconstriñen de forma inversa un evento fisiológico que se produce típicamente en la fase temprana de las reacciones asmáticas generando una disminución de la capacidad pulmonar y falta de aliento. Los ejemplos de broncodilatadores incluyen epinefrina, un adrenérgico alfa y beta de amplio campo de acción y los adrenérgicos beta albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol e isoetarina. La broncodilatación también se puede conseguir a través de la administración de xantinas, incluyendo aminofilina y teofilina.

Un "*glucocorticoide*", tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, describe a agentes basados en esteroides que tienen una actividad antiinflamatoria. Los glucocorticoides se usan habitualmente para atenuar la reacción asmática de fase tardía. Ejemplos de glucocorticoides incluyen prednisona, dipropionato de beclometasona, triamcinolona acetonida, flunisolida, betametasona, budesonida, dexametasona, desamehasona tramcinolona, acetato de fludrocortisona, flunisolida, propionato de fluticasona, hidrocortisona, prednisolona [incluyendo metilprednisolona (*por ejemplo*, succinato sódico de metilprednisolona SOLU-MEDROL®)] y triamcinolona.

Un "*fármaco antiinflamatorio no esteroide*" o "*NSAID*", tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, describe a agentes con una actividad antiinflamatoria que no están basados en esteroides. Ejemplos de NSAID incluyen acematacina, acetaminofeno, aspirina, azapropazona, benorilato, bromfenac sódico, inhibidores de la ciclooxigenasa (COX)-2 como GR 253035, MK966, celecoxib (CELEBREX®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) benceno-sulfonamida) y valdecoxib (BEXTRA®), diclofenac, diclofenac retardado, diclofenac sódico, diflunisal, etodolac, fenbufeno, fenoprofeno cálcico, flurbiprofeno, ibuprofeno, ibuprofeno retardado, indometacina, quetoprofeno, meclofenamato sódico, ácido mefenámico, meloxicam (MOBIC®), nabumetona, naproxeno, naproxeno sódico, oxifenbutazona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tenoxicam, ácido tiaprofénico, tolmetín, tolmetín sódico, incluyendo sales y derivados de los mismos, *etc*.

El término *"trastornos mediados por IgE"* incluye trastornos atópicos, que se caracterizan por una propensión general transmitida genéticamente a responder inmunológicamente a muchos antígenos comunes inhalados e ingeridos que se generan naturalmente y a la producción continua de anticuerpos de IgE. Los trastornos atópicos específicos incluyen asma alérgica, rinitis alérgica (conjuntivitis), dermatitis atópica, alergias alimentarias, anafilaxis, dermatitis de contacto, gastroenteropatía alérgica, aspergilosis broncopulmonar alérgica y púrpura alérgica (Henoch-Schönlein). Los pacientes atópicos suelen tener alergias múltiples, lo cual significa que tienen anticuerpos de IgE para, y síntomas de, muchos alergenos medioambientales, incluidos los alergenos estacionales, perennes y ocupacionales. Los ejemplos de alergenos estacionales incluyen a los pólenes (*es decir,* hierba, árbol, centeno, fleo, artemisa), mientras que los ejemplos de alergenos perennes incluyen a los hongos (*es decir,* mohos, esporas de mohos), plumas, animales (*es decir,* caspa de animales domésticos u otros animales) y detritus de insectos (*es decir,* ácaros del polvo). Los ejemplos de alergenos ocupaciones también incluyen antígenos animales (p.ej. ratones) y vegetales, así como medicamentos, detergentes, metales e inmunopotenciadores como los isocianatos. Los estímulos específicos no antígenos que pueden traducirse en una reacción mediada por IgE incluyen infección, irritantes como el humo, humos de combustión, partículas emitidas por los motores de gasóleo y dióxido sulfúrico, ejercicio, frío y estrés emocional. Las reacciones hipersensitivas específicas en individuos atópicos y no atópicos con determinado historial genético pueden resultar de la exposición a las proteínas presentes en los alimentos (*p.ej.,* legumbre, cacahuetes), veneno *(p.ej.,* insecto, serpiente), vacunas, hormonas, antisuero, enzimas, látex, antibióticos, relajantes musculares, vitaminas, citotoxinas, opiáceos y polisacáridos como dextrina, dextrano de hierro y poligelina.

Otros trastornos asociados con niveles elevados de IgE, que parecen ser mediados por IgE y son tratables con las formulaciones de esta invención incluyen: ataxia-telangiectasia, síndrome de Churg-Strauss, eczema, enteritis, gastroenteropatía, reacción injerto contra huésped, síndrome de híper-IgE (de Job), hipersensibilidad (*p.ej.,* hipersensibilidad anafiláctica, candidiasis, vasculitis), mieloma de IgE, enfermedad inflamatoria del intestino *(p.ej.,* enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, colitis indeterminada y colitis infecciosa), mucositis (*p.ej.,* mucositis oral, mucositis gastrointestinal, mucositis nasal y proctitis), enterocolitis necrotizante y esofagitis, enfermedades parasitarias *(p.ej.,* tripanosomiasis), vasculitis por hipersensibilidad, urticaria y síndrome de Wiskott-Aldrich.

Además, los trastornos que pueden ser tratables disminuyendo los niveles de IgE, estén o no asociados con un IgE elevado, por lo que deberían considerarse dentro del ámbito del "trastorno mediado por IgE", incluyen: enfermedad de Addison (insuficiencia adenocortical crónica), alopecia, angioedema hereditario, angioedema (enfermedad de Bannister, edema angioneurótico), espondilitis anquilosante, anemia aplástica, arteritis, amiloidosis, trastornos inmunes, como anemia hemolítica autoinmune, ooforitis autoinmune, orquitis autoinmune, deficiencia poliendocrina, anemia hemolítica autoinmune, autoinmunocitopenia, glomerulonefritis autoinmune, enfermedad de Behcet, bronquitis, enfermedad de Buerger, penfigoide bulboso, síndrome de Caplan (neumoconiosis reumatoide), carditis, síndrome de Chediak-Higashi, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome

de Cogan-Reese (síndrome endotelial iridocorneal), síndrome de CREST, dermatitis herpetiforme (enfermedad de Duhring), diabetes mellitus, fascitis eosinofílica, nefritis eosinofílica, episcleritis, alveolitis alérgica extrínseca, poliserositis paroxística familiar, síndrome de Felty, alveolitis fibrosa, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, granulociteponia, granuloma, granulomatosis, miositis granuloma, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre (polineuritis), tiroiditis de Hashimoto (bocio linfadenoide), hemocromatosis, histocitosis, síndrome hipereosinofílico, síndrome de intestino irritable, artritis juvenil, queratitis, lepra, lupus eritematoso, enfermedad de Lyell, enfermedad de Lyme, enfermedad mixta del tejido conectivo, mononeuritis, mononeuritis múltiple, síndrome de Muckle-Wells, síndrome linfoide mucocutáneo (enfermedad de Kawasaki), reticulohistiocistosis multicéntrica, esclerosis múltiple, miastenia gravis, micosis fungoide, paninculitis, penfigoide, pénfigo, pericarditis, polineuritis, poliarteritis nodosa, psoriasis, artritis psoriásica, artritis pulmonar, adenomatosis pulmonar, fibrosis pulmonar, policondritis recidivante, fiebre reumática, artritis reumatoide, rinosinusitis (sinusitis), sarcoidosis, escleritis, colangitis esclerosante, enfermedad del suero, síndrome de Sézary, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, mastocitosis sistémica, rechazo de trasplante, púrpura trombocitopénica, alinfoplasia tímica, uveitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener.

En la presente memoria descriptiva, una *"enfermedad autoinmune"* es una enfermedad o trastorno que se genera en los propios tejidos u órganos de un individuo, o un cosegregado, una manifestación o un estado resultante del mismo. En muchos de estos trastornos inflamatorios y autoinmunes pueden existir diversos marcadores clínicos y de laboratorio, incluyendo, aunque sin limitarse a, hipergammaglobulinemia, niveles altos de autoanticuerpos, depósitos del complejo antígeno-anticuerpo en tejidos, beneficio de tratamientos con corticoesteroides o inmunosupresores y agregados de linfocitos en tejidos afectados. Sin limitación a ninguna teoría relativa a trastornos autoinmunes mediados por linfocitos B, se cree que los linfocitos B muestran un efecto patogénico en enfermedades autoinmunes humanas a través de múltiples vías y mecanismos, incluida la producción de autoanticuerpos, la formación de inmunocomplejos, la activación de células dendríticas y linfocitos T, la síntesis de citocinas, la liberación directa de quimiocinas y el suministro de un nido para neolinfogénesis ectópica. Cada una de estas vías puede participar en diferentes grados en la patología de las enfermedades autoinmunes.

La *"enfermedad autoinmune"* puede ser una enfermedad de un órgano específico (es decir, la respuesta inmune se dirige específicamente contra un sistema orgánico tal como el sistema endocrino, el sistema hematopoyético, la piel, el sistema cardiopulmonar, los sistemas gastrointestinales y hepáticos, el sistema renal, el tiroides, los oídos, el sistema neuromuscular, el sistema nervioso central, etc.) o una enfermedad sistémica que puede afectar a muchos sistemas orgánicos (por ejemplo, lupus sistémico eritematoso (LSE), artritis reumatoide, polimiositis, etc.). Enfermedades preferentes de este tipo son trastornos reumatológicos autoinmunes (como, por ejemplo, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, escleroderma, lupus, como LES y nefritis lúpica, polimiositis/dermamiositis, crioglobulinemia, síndrome de anticuerpos antifosfolipídicos y artritis psoriásica), trastornos digestivos y hepáticos autoinmunes (como, por ejemplo, enfermedades inflamatorias intestinales (por ejemplo, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), gastritis autoinmune

y anemia perniciosa, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y enfermedad celiaca), vasculitis (como, por ejemplo, vasculitis negativa para ANCA y vasculitis asociada a ANCA, incluida vasculitis de Churg-Strauss, granulomatosis de Wegener y poliangiitis microscópica), trastornos neurológicos autoinmunes (como, por ejemplo, esclerosis múltiple, síndrome mioclono opsoclono, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer y polineuropatías autoinmunes), trastornos renales (como, por ejemplo, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture y enfermedad de Berger), trastornos dermatológicos autoinmunes (como, por ejemplo, psoriasis, urticaria, pénfigo vulgaris, penfigoide buloso y lupus eritematoso cutáneo), trastornos hematológicos (como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica, púrpura trombocitopénica trombótica, púrpura tras transfusión y anemia hemolítica autoinmune), ateroesclerosis, uveitis, enfermedades autoinmunes del oído (como, por ejemplo, enfermedad del oído interno y pérdida auditiva), enfermedad de Behcet, síndrome de Raynaud, trasplante de órganos y trastornos endocrinos autoinmunes (como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes asociadas a diabéticos como diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), enfermedad de Addison y enfermedad autoinmune del tiroides (por ejemplo, enfermedad de Graves y tiroiditis). Otras enfermedades más preferentes incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, vasculitis asociada a ANCA, lupus, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, IDDM, anemia perniciosa, tiroiditis y glomerulonefritis.

El término *"agente citotóxico"*, en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa su destrucción. El término incluye isótopos radiactivos (*por ejemplo*, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} y los isótopos radiactivos de Lu) y toxinas como las de molécula pequeña o las enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un *"agente quimioterapéutico"* es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos serían los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfano, el improsulfano y el piposulfano; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; el pemetrexed; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; TLK-286; el CDP323, un inhibidor oral de la integrina alfa-4; una sarcodictina; la espongistatina; los gases nitrógeno como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la

prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (*por ejemplo*, la calicheamicina, especialmente la calicheamicina gamma 1I y la omega I1 (véase, *por ejemplo,* Nicolaou *y col.*, *Angew. Chem. Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados (las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina, la inyección de liposomas de doxorrubicina HC1 (DOXIL®) y la desoxidoxorrubicina), la epirrubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato, la gemcitabina (GEMZAR®), el tegafur (UFTORAL®), la capecitabina (XELODA®), una epotilona y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato; los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina, la floxuridina y el imatinib (un derivado de 2-fenilaminopirimidina), así como otros inhibidores de c-Kit; los antiadrenales como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatín; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbacina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofirán; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbacina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, *por ejemplo*, el paclitaxel (TAXOL®), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina (ABRAXANE™) y el doxetaxel (TAXOTERE®); el clorambucil; la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metotrexato; los análogos del platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorrelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico y las sales, los ácidos o los derivados

farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de dos o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en forma de un tratamiento sistémico, es decir, que afecta a todo el organismo. Estos agentes podrán ser hormonas. Como ejemplos tendríamos los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los antagonistas de los receptores de estrógenos como el fulvestrant (FASLODEX®); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona leutinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; los antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben el enzima aromatasa, encargado de regular la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), la letrozola (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (*por ejemplo*, LURTOTECAN®); un antiestrogénico como fulvestrant; un inhibidor de Kit como imatinib o EXEL-0862 (un inhibidor de la tirosincinasa); un inhibidor del EGFR como erlotinib o cetuximab; un inhibidor anti-VEGF como bevacizumab; arinotecán; el rmRH (por ejemplo, ABARELIX®); el lapatinib y el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de la tirosincinasa doble del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016); el 17AAG (derivado de la geldanamicina que es una toxina de la proteína de choque térmico (Hsp) 90) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

Por *"agente inhibidor del crecimiento"* se entiende un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de un receptor *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento incluye uno que reduzca significativamente el

porcentaje de células dependientes del receptor en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen las vincas y alcaloides de la vinca (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorrubicina, la epirrubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos) por Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos anticancerígenos derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb).

El término *"citocina"* es un término genérico para aquellas proteínas, liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Entre los ejemplos de dichas citocinas están las linfocinas, monocinas; interleucinas (IL) como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, incluida PROLEUKIN® rIL-2; un factor de necrosis tumoral como TNF-α o TNF-β; y otros factores polipeptídicos incluidos LIF y un ligando Kit (KL). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término *"hormona"* se refiere a hormonas polipéptidas, generalmente segregadas por los órganos glandulares con conductos. Entre estas hormonas se incluyen, por ejemplo, las hormonas del crecimiento como la del crecimiento humano, el crecimiento humano N-metionil y el crecimiento bovino; la hormona paratiroide; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; el estradiol; la terapia de sustitución hormonal; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, la mepitiostana o la testolactona; la prorrelaxina; las hormonas glicoproteínas como la hormona de estimulación folicular (FSH), la hormona de estimulación tiroidea (TSH) y la hormona luteinizante (LH); la prolactina; el lactógeno placentario; el péptido asociado a la gonadotropina murina; la hormona de liberación de la gonadotropina; la inhibina; la activina; la sustancia inhibidora mulleriana y la trombopoyetina. En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término hormona incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las hormonas de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término *"factor de crecimiento"* se refiere a las proteínas que fomentan el crecimiento e incluyen, por ejemplo, el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico; el

factor de crecimiento endotelial vascular; los factores de crecimiento nervioso como el NGF-β; el factor de crecimiento derivado de las plaquetas; los factores de crecimiento transformador (TGF) como el TGF-α y el TGF-β; los factores I y II de crecimiento similar a la insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones como el interferón-α, el β y el γ y los factores de estimulación de colonias (CSF) como el macrófago-CSF (M-CSF), el granulocito-macrofago-CSF (GM-CSF) y el granulocito-CSF (G-CSF). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término factor de crecimiento incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos del factor de crecimiento de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

El término *"integrina"* se refiere a una proteína receptora que permite a las células tanto unirse como responder a la matriz extracelular e interviene en diversas funciones celulares como la curación de heridas, la diferenciación celular, la migración de células tumorales y la apoptosis. Forman parte de una gran familia de receptores de adhesión celular que participan en la matriz extracelular de las células y las interacciones entre células. Las integrinas funcionales constan de dos subunidades de glicoproteína transmembrana, llamadas alfa y beta, que están unidas de forma no covalente. Todas las subunidades alfa comparten cierta homología entre sí, al igual que las beta. Los receptores siempre contienen una cadena alfa y una beta. Ejemplos de estos receptores serán el Alpha6beta1, el Alpha3beta1, el Alpha7beta1, el LFA-1 *etc.* En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "integrina" incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de la integrina de secuencia nativa, incluyendo entidades de molécula pequeña producidas por vía sintética y los derivados y las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

Por "*antagonista del TNF"* se entiende en la presente memoria descriptiva una molécula que reduce, bloquea, inhibe, elimina o interfiere la actividad del *in vitro, in situ* y/o preferiblemente *in vivo*. Un antagonista del TNF adecuado puede también reducir, bloquear, eliminar, impedir y/o inhibir la síntesis de proteínas, ADN o ARN por TNF, la liberación del TNF∀, la señalización del receptor de TNF∀, la escisión del TNF∀ en la membrana, la actividad del TNF∀, la producción y/o síntesis del TNF∀, así como interferir en todas ellas. Entre los antagonistas del TNF se encuentran anticuerpos anti-TNF∀, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, mutantes especificados o dominios de los mismos que se unen específicamente al TNF∀ que, tras la unión al TNF∀, destruyen o eliminan células que expresan el TNF∀ en un mamífero y/o interfieren en una o más funciones de estas células, un receptor del TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión de los mismos, un antagonista de molécula pequeña del TNF, por ejemplo, la proteína I o II de unión a TNF (TBP-I o TBP-II), nerelimonmab, CDP-571, infliximab, enteracept (ENBREL™), adalimulab (HUMIRA™), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, y similares), fragmentos de unión a antígeno del mismo y moléculas del receptor que se unen específicamente al TNF∀; compuestos que impiden y/o inhiben la síntesis del TNF∀, la liberación del TNF∀ o su acción en células diana, como talidomida, tenidap, inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de la adenosina A2b y potenciadores del receptor de la adenosina

A2b; compuestos que impiden y/o inhiben la señalización del receptor del TNFA, como inhibidores cinasa de la proteína activada por mitógenos (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la escisión del TNFA en la membrana, como inhibidores de la metaloproteinasa; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad del TNFA, como los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o síntesis del TNFA, como los inhibidores cinasa de la MAP. El antagonista preferente está constituido por un anticuerpo.

Por *"factor alfa de necrosis tumoral"*, "TNF-alfa" o "TNFA" se entiende una molécula humana del TNFA que comprende la secuencia de aminoácidos descrita en Pennica *y col., Nature,* 312:721 (1984) o Aggarwal *y col., JBC*, 260:2345 (1985). Un "inhibidor del TNFA" según la presente memoria descriptiva es un agente que inhibe, en cierta medida, una función biológica del TNFA, generalmente mediante la unión al TNFA y la neutralización de su actividad. Ejemplos de inhibidores del TNFA específicamente estudiados en la presente memoria descriptiva son el etanercept (ENBREL®), el infliximab (REMICADE®) y el adalimumab (HUMIRA™).

En la presente memoria descriptiva, los ejemplos de *"antagonistas o anticuerpos de la integrina"* incluirían un anticuerpo LFA-1, como el efalizumab (RAPTIVA®), comercializado por Genentech, o un anticuerpo de la integrina alfa 4 como el natalizumab (ANTEGREN®), comercializado por Biogen, o los derivados de la fenilalanina diazacíclica (documento WO 2003/89410), los derivados de la fenilalanina (documentos WO 2003/70709, WO 2002/28830, WO 2002/16329 y WO 2003/53926), los derivados del ácido fenilpropiónico (documento WO 2003/10135), los derivados de la enamina (documento WO 2001/79173), los derivados del ácido propanoico (documento WO 2000/37444), los derivados del ácido alcanoico (documento WO 2000/32575), los derivados del fenil sustituido (patente de EE.UU. n°s 6.677.339 y 6.348.463), los derivados de la amina aromática (patente de EE.UU. nº 6.369.229), los polipéptidos del dominio de la disintegrina ADAM (documento US2002/0042368), los anticuerpos de la integrina alfavbeta3 (documento EP 633945), los derivados de los aminoácidos bicíclicos con puente aza (documento WO 2002/02556), *etc.*

Por *"agente inmunosupresor"* se entiende la sustancia que suprime o enmascara el sistema inmunológico del sujeto que se trata en la presente memoria descriptiva. Estos agentes incluirían sustancias que suprimen la producción de citocinas, regulan a la baja o suprimen la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Entre los ejemplos de estos agentes están las pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (véase la patente de EE.UU. nº 4.665.077); los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE); el ganciclovir, el tacrolimus, los glucocorticoides como el cortisol o la aldosterona, los agentes antiinflamatorios como un inhibidor de la ciclooxigenasa, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa o un antagonista receptor del leucotrieno; los antagonistas de la purina como la azatioprina o el micofenolato mofetil (MMF); trocade (Ro32-355); un antagonista del receptor sigma periférico como ISR-31747; los agentes alquilantes como la ciclofosfamida; la bromocriptina; el danazol; la dapsona; el glutaraldehído (que enmascara los antígenos del MHC, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 4.120.649); los anticuerpos anti-idiotópicos para los antígenos y fragmentos del MHC; la ciclosporina A; los esteroides como los

corticoesteroides, los glucocorticoesteroides o los análogos de los glucocorticoides, por ejemplo, prednisona, metilprednisolona, incluido el succinato sódico de metilprednisolona SOLU-MEDROL®, rimexolona y dexametasona; los inhibidores de la dihidrofolato reductasa como el metotrexato (oral o subcutáneo); los agentes contra la malaria como la cloroquina y la hidroxicloroquina; la sulfasalazina; la leflunomida; los inhibidores de liberación de citocina como los anticuerpos monoclonales SB-210396 y SB-217969 y un antagonista del MHC II como ZD2315; un antagonista del receptor de PG1 como ZD4953; un bloqueante de la adhesión a VLA4 como ZD7349; los anticuerpos anticitocinas o los anticuerpos anti-receptores de citocinas, incluidos los anticuerpos anti-interferón alfa, beta o gamma, los anticuerpos anti-TNF)-∀ (infliximab (REMICADE®) o adalimumab), la inmunoadhesina anti-TNF-∀ (etanercept), los anticuerpos anti-TNF-beta, los bloqueadores de la interleucina-1 (IL-1) como el inhibidor IL-1B y HuIl-1Ra recombinante; los anticuerpos anti-interleucina-2 (IL-2) y anti-receptores de IL-2; la toxina de fusión IL-2; los anticuerpos anti-L3T4; leflunomida; la globulina anti-linfocitos heteróloga; OPC-14597; NISV (modificador de la respuesta inmune); un ácido graso esencial, como el ácido gammalinolénico o el ácido eicosapentanoico; los bloqueadores de CD-4; los anticuerpos anti-pan-T, preferentemente los anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; un modificador coestimulante (por ejemplo, fusión a CTLA4-Fc, también conocido como ABATACEPT™; los anticuerpos y antagonistas anti-receptor de la interleucina-6 (IL-6); los anticuerpos anti-LFA-1, incluidos los anticuerpos anti-CD11a y anti-CD18; un péptido soluble que contenga un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 1990/08187); la estreptoquinasa; IL-10; el factor de crecimiento transformador-beta (TGF-beta); la estreptodornasa; el ARN o ADN del anfitrión; el FK506; el RS-61443; enlimomab; CDP-855; el inhibidor de PNP; CH-3298; GW353430; 4162W94, el clorambucil; la desoxispergualina; la rapamicina; el receptor de células T (patente de EE.UU. nº 5.114.721); los fragmentos del receptor de células T (Offner *y col.*, *Science*, 251: 430-2 (1991); el documento WO 1990/11294; Janeway, *Nature*, 341: 482 (1989) y el documento WO 1991/01133); los antagonistas del BAFF como los anticuerpos anti-BAFF y los anticuerpos anti-BR3; los antagonistas del zTNF4 (Mackay y Mackay, *Trends Immunol.*, 23:113-5 (2002)); los agentes biológicos que interfieren en las señales auxiliares de las células T, como el receptor anti-CD40 o el ligando anti-CD40 (CD154), incluyendo los anticuerpos de bloqueo del ligando CD40-CD40 (*por ejemplo*, Durie *y col.*, *Science*, 261: 1328-30 (1993); Mohan *y col., J. Immunol.*, 154: 1470-80 (1995)) y CTLA4-Ig (Finck *y col., Science*, 265: 1225-7 (1994)) y los anticuerpos de receptores de células T (patente europea 340.109) como el T10B9. Algunos agentes inmunosupresores preferentes en la presente memoria descriptiva incluyen ciclofosfamida, clorambucil, azatioprina, leflunomida, mMF o metotrexato (MTX).

Los ejemplos de *"fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad"* o *"DMARD"* incluyen, por ejemplo, la cloroquina, la hidroxicloroquina, la miocrisina, la auranofina, la sulfasalazina, el metotrexato, la leflunomida, el etanercept, el infliximab (más metotrexato oral y subcutáneo), la azatioprina, la D-penicilamina, las sales doradas (orales), las sales doradas (intramusculares), la minociclina, la ciclosporina, por ejemplo, la ciclosporina A y la ciclosporina tópica, la proteína A e*stafilococal* (Goodyear y Silverman, *J. Exp. Med.*, 197:1125-39 (2003)), incluidas las sales y los derivados de la misma, etc.

Una *"célula B"* es un linfocito que madura dentro de la médula ósea, e incluye una célula B virgen, una célula B de memoria o una célula B efectora (células plasmáticas). En la presente memoria descriptiva, la célula B puede ser normal o benigna.

En la presente memoria descriptiva, un "marcador de la superficie de células B" o "antígeno de la superficie de células B" es un antígeno que se expresa en la superficie de una célula B y se puede actuar sobre él mediante un antagonista al que se une. Entre los marcadores ejemplares de la superficie de células B se encuentran los marcadores de la superficie de leucocitos CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 y CD86 (para conocer sus descripciones, consulte *The Leukocyte Antigen Facts Book*, 2ª edición, 1997, editores Barclay *y col.*, Academic Press, Harcourt Brace & Co., Nueva York). Otros marcadores de la superficie de células B incluyen el RP105, el FcRH2, el CR2 de células B, el CCR6, el P2X5, el HLA-DOB, el CXCR5, el FCER2, el BR3, el Btig, el NAG14, el SLGC16270, el FcRH1, el IRTA2, el ATWD578, el FcRH3, el IRTA1, el FcRH6, el BCMA, y el 239287. El marcador de la superficie de células B preferente se expresa preferentemente en las células B en comparación con los otros tejidos de un mamífero que no pertenecen a células B, y se puede expresar tanto en células B precursoras como maduras. Los más preferentes de estos marcadores son CD20 y CD22.

El antígeno "CD20", o "CD20", es una fosfoproteína no glicosilada, de aproximadamente 35-kDa, que se encuentra en la superficie de más del 90% de las células B de la sangre periférica o los órganos linfoides. El CD20 está presente tanto en células B normales como malignas, pero no se expresa en las células madre. Otros nombres que se dan al CD20 en la bibliografía son "antígeno restringido a linfocitos B" y "Bp35". El antígeno CD20 se describe en Clark *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82:1766 (1985), por ejemplo.

El "antígeno CD22", o "CD22", también conocido como BL-CAM o Lyb8, es un tipo de glicoproteína de membrana integral de tipo 1 con un peso molecular de unos 130 (reducido) a 140 kD (no reducido). Se expresa en la membrana tanto celular como citoplasmática de linfocitos B. El antígeno CD22 aparece temprano en la diferenciación de linfocitos B, aproximadamente en la misma etapa que el antígeno CD19. A diferencia de otros marcadores de células B, la expresión en la membrana de CD22 está limitada a las etapas tardías de la diferenciación comprendidas entre células B maduras (CD22+) y células plasmáticas (CD22-). El antígeno CD22 se describe, por ejemplo, en Wilson *y col., J. Exp. Med.*, 173:137 (1991) y Wilson *y col., J. Immunol.*, 150:5013 (1993).

Un "anticuerpo que se une a un marcador de superficie de las células B" es una molécula que, al unirse a un marcador de superficie de las células B, destruye o reduce las células B de un mamífero y/o interfiere en una o más de las funciones de las células B, *por ejemplo*, disminuyendo o impidiendo la respuesta humoral que las células B provocan. Preferentemente, el anticuerpo es capaz de reducir las células B (*es decir*, disminuir los niveles de células B circulantes) en un mamífero tratado con dicho anticuerpo. Esta reducción puede conseguirse a través de diversos mecanismos, como la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la inhibición de la proliferación de células B y/o la inducción de la muerte de las células B (*por ejemplo*, mediante apoptosis).

Ejemplos de anticuerpos anti-CD20 son: "C2B8," que actualmente se llama "rituximab" ("RITUXAN®") (Patente EE.UU. No. 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 denominado itrio-[90] designado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) comercializado por IDEC Pharmaceuticals, Inc. (Patente EE.UU. No. 5.736.137; 2B8 inscripta con ATCC bajo el registro no. HB11388 el 22 de junio de 1993); murino IgG2a "B1," también llamado "Tositumomab", opcionalmente denominado ^{131}I para generar el "131I-B1" o anticuerpo "iodina I131 tositumomab" (BEXXAR™) comercializado por Corixa (véase, además, Patente EE.UU. No. 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *y col. Blood* 69 (2):584-591 (1987) y variantes del mismo incluyendo una "estructura parcheada" o 1F5 humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depósito en la ATCC HB-96450); el anticuerpo murino anti-2H7 y el quimérico anti-2H7 (patente de EE.UU. n° 5.677.180); el anti-2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *y col.*, y como se establece más adelante); el anticuerpo totalmente humano HUMAX-CD20™, de alta afinidad, dirigido a la molécula del CD20 en la membrana celular de las células B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y Van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg *y col., Blood* 101: 1045-1052 (2003)); los anticuerpos monoclonales humanos indicados en el documento WO04/035607 (Teeling *y col.*); los anticuerpos AME-133™ (Applied Molecular Evolution); el anticuerpo A20 o variantes del mismo, como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) (la solicitud de patente de EE.UU. 2003/0219433, Immunomedics); y los anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 comercializados por el International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *y col.*, En: *Leukocyte Typing* III, (McMichael, Ed., página 440, Oxford University Press (1987)). Los anticuerpos preferentes del CD20 en la presente memoria descriptiva son anticuerpos anti-CD20 humanizados, quiméricos o humanos, más preferentemente, rituximab, un anticuerpo 2H7 humanizado, un anticuerpo A20 quimérico o humanizado (Immunomedics), y un anticuerpo anti-CD20 humano HUMAX-CD20™ (Genmab).

En la presente memoria descriptiva, los términos "rituximab" o "RITUXAN®" se refieren al anticuerpo monoclonal murino/humano, quimérico y creado mediante ingeniería genética, dirigido contra el antígeno CD20 y denominado "C2B8" en la patente de EE.UU. n° 5.736.137, incluyendo fragmentos del mismo que retienen la capacidad de unirse al CD20.

A efectos únicamente de la presente memoria descriptiva y salvo indicación en contrario, por "2H7 humanizado" se entiende un anticuerpo anti-CD20 humanizado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo es eficaz para reducir las células B de primates *in vivo*. El anticuerpo incluye los expuestos en el documento US 2006/0062787 y las figuras del mismo e incluye la versión 114, de la que se proporcionan las secuencias en el documento US 2006/0188495. Véanse también los documentos US 2006/0034835 y US 2006/0024300. En un resumen de diversas formas de realización preferentes de la invención, la región V de variantes basadas en la versión 16 de 2H7 que se expone en el documento US 2006/0062787 tendrá las secuencias de aminoácidos de v16, salvo en las posiciones de sustituciones aminoacídicas que se indican en la tabla que figura a continuación. Salvo indicación en contrario, las variantes 2H7 tendrán la misma cadena L que la de la variante v16.

Versión 2H7	Cambios en la cadena pesada (V_H)	Cambios en la cadena ligera (V_L)	Cambios en Fc
16			-
31	-	-	S298A, E333A, K334A
73	N100A	M32L	
75	N100A	M32L	S298A, E333A, K334A
96	D56A, N100A	S92A	
114	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A
115	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, E356D, M358L
116	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, K334A, K322A
138	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A
477	D56A, N100A	M32L, S92A	S298A, E333A, K334A, K326A, N434W
375	-	-	K334L

Un 2H7 humanizado preferente es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo intacto que tiene la secuencia de la versión 16. Otro 2H7 humanizado preferente tiene las secuencias de la versión 114.

Los "antagonistas BAFF" son moléculas que bloquean la actividad de BAFF o BR3. Incluyen inmunoadhesinas que contienen una porción de BR3, TACI o BCMA que se une a BAFF o variantes de las mismas que se unen a BAFF. En otros aspectos, el antagonista de BAFF es un anticuerpo anti-BAFF. Un "anticuerpo anti-BAFF" es un anticuerpo que se une a BAFF y preferentemente se une a BAFF dentro de una región de BAFF humano que comprende los residuos 162-275 de BAFF humano. En otro aspecto, el antagonista de BAFF es un anticuerpo anti-BR3. Un "anticuerpo anti-BR3" es un anticuerpo que se une a BR3 y preferentemente se une a BR3 dentro de una región de BR3 humano que comprende los residuos 23-38 de BR3 humano. Las secuencias de BAFF humano y de BR3 humano se encuentran, por ejemplo, en la solicitud de patente de EE.UU. 2006/0062787. Otros ejemplos de polipéptidos de unión a BAFF o anticuerpos anti-BAFF se pueden encontrar, *por ejemplo*, en los documentos WO 2002/092620, WO 2003/014294, WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 y WO 2000/40716, Gordon *y col.*, *Biochemistry*, 42(20):5977-83 (2003) y Kelley *y col.*, *J. Biol. Chem.*, 279:16727-35 (2004), WO 1998/18921, WO 2001/12812, WO 2000/68378 y WO 2000/40716.

El "anticuerpo anti-IgE" incluye a cualquier anticuerpo que se une específicamente a IgE de manera que no induce reticulación cuando IgE se une a un receptor de alta afinidad en mastocitos y basófilos. Los anticuerpos ejemplares incluyen a los anticuerpos de la invención, así como a rhuMabE25 (E25, XOLAIR®), E26, E27, además de CGP-5101 (Hu-901) y el anticuerpo HA. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos humanizados anti-IgE E25, E26 y E27 se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.172.213 y WO99/01556. El anticuerpo CGP-5101 (Hu-901) se describe en Corne y col., (1997), J. Clin. Invest. 99(5): 879-887, WO 92/17207 y ATCC Dep. Nos. BRL-10706, BRL-11130, BRL-11131, BRL-11132 y BRL-11133. El anticuerpo HA se describe en USSN 60/444,229, WO2004/070011 y WO2004/070010.

II. Modos de realización de la invención

A Preparación recombinante

La invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica anticuerpos apoptóticos anti-IgE, vectores y células huésped que comprenden dicho ácido nucleico y técnicas recombinantes para la producción del anticuerpo.

Para la producción recombinante del anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para clonación subsiguiente (amplificación del ADN) o para expresión. Se aísla el ADN que codifica el anticuerpo monoclonal y se secuencia utilizando procedimientos convencionales *(por ejemplo,* usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Hay muchos vectores disponibles. Los componentes del vector suelen incluir, entre otros, uno o más de los elementos siguientes: una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, y un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción.

(1) Componente de secuencia de la señal

Los anticuerpos anti-IgE de esta invención pueden producirse de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferiblemente una secuencia de señal u otro polipéptido con una escisión específica en el término N de la proteína madura o polipéptido. La secuencia de señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que la célula huésped reconoce y procesa (*es decir,* escindida por una peptidasa de señal). Para las células huésped procarióticas que no reconocen ni procesan la secuencia de señal del mamífero nativo, la secuencia de señal se sustituye mediante una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de entre un grupo de fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o líderes de enterotoxina II termoestable. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal nativa puede ser sustituida, *por ejemplo*, por el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor (incluidos los líderes del factor *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión celular de los mamíferos, están disponibles las secuencias de señal de los mamíferos así como los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal del herpes simplex gD.

El ADN para la región de dicho precursor está ligado en la estructura de lectura al ADN que codifica al anticuerpo que se une a IgE.

(2) Origen de la replicación

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Por lo general, en los vectores de clonación esta secuencia permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del huésped e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es apto para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen plasmídico 2μ es adecuado para la levadura y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos. Por lo general, el componente origen de la replicación no es necesario para los vectores de expresión

en mamíferos (el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor precoz).

(3) Componente gen de selección

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, como por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) proporcionan nutrientes importantes que no se encuentran disponibles en otros medios complejos, como por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli.*

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Estas células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y, así, sobrevive a la estrategia de selección. Ejemplos de esta selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de las células encargadas de absorber el ácido nucleico del anticuerpo que se une a IgE, como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferiblemente genes de metalotioneína en primates, adenosina deaminasa, ornitina decarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican primero a través del cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo del DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza el DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad del DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, las células huésped (en especial los huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican al anticuerpo que se une a IgE, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable como la aminoglicosida 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse mediante crecimiento celular en medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE.UU. N° 4.965.199.

Un gen de selección apto para su uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *y col., Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, como por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula huésped de la levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptofano. De forma similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu-2* (ATCC 20.622 o 38.626) están complementadas por plásmidos conocidos portadores del gen *Leu-2.*

Además, los vectores que se derivan del plásmido circular pKD1 de 1,6 µm se pueden utilizar para la transformación de las levaduras *Kluyveromyces.* Alternativamente, se refirió un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K.*

lactis. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han descubierto los vectores de expresión multicopia estables para la secreción de albúmina sérica humana recombinante madura por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(4) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente enlazado al ácido nucleico que codifica el anticuerpo que se une a IgE. Los promotores aptos para su uso con huéspedes procarióticos incluyen el promotor phoA, los sistemas promotores de lactosa y -lactamasa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor a base de triptofano (trp) y promotores híbridos como el promotor tac. No obstante, también son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente enlazada al ADN que codifica al anticuerpo de unión a IgE.

Se conocen las secuencias de promotores para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucarióticos poseen una región rica en AT situada aproximadamente entre las bases 25 y 30 antes sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre las bases 70 y 80 antes del el inicio de la transcripción de muchos genes es la región CNCAAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucarióticos se encuentra 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. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en los vectores de expresión eucariótica.

Entre los ejemplos de secuencias de promotores adecuados para uso con huéspedes de levadura están los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de la levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de tener una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotores para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para el uso en la expresión de levadura se describen con más detalle en la patente europea 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan favorablemente con los promotores de levadura.

La transcripción del anticuerpo de unión a IgE a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el poliomavirus, el virus de la viruela de las aves de corral, el adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y, preferiblemente, el Simian Virus 40 (SV40); a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina; a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen fácilmente como un fragmento de restricción del SV40, que también contiene el origen viral de replicación del SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene fácilmente en forma de un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para la expresión del ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como vector se da a conocer en la Patente de Estados Unidos nº 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de Estados Unidos Nº 4.601.978. Véase también Reyes y col., *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del interferón beta humano en células de ratón bajo control de un promotor timidina cinasa a partir del virus del herpes simplex. Alternativamente, la repetición del terminal largo del virus del sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(5) Componente elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifique al anticuerpo de unión a IgE de esta invención a través de eucariotas más altas se aumenta con frecuencia al insertar la secuencia de un potenciador en el vector. Se conocen ya muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína alfa e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (bp 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) acerca de los elementos de potenciación para activar los promotores eucarióticos. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' a la secuencia de codificación del anticuerpo de unión a IgE, pero está situado preferentemente en un sitio 5' desde el promotor.

(6) Componente finalización de la transcripción

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (células de levadura, fúngicas, de insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contarán con secuencias necesarias para finalizar la transcripción y estabilizar el ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles desde las regiones no traducidas del extremo 5' y ocasionalmente el 3' de los ADN o ADNc virales o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica al anticuerpo de unión a IgE. Un componente de finalización de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión que se da a conocer en el mismo.

(7) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva son las células procariotas, de levadura o eucariotas más altas descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para este fin incluyen eubacterias, como organismos grampositivos o gramnegativos, por ejemplo, enterobacteriáceas como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P dado a conocer en el documento DD 266.710

publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonación preferido de *E. coli* es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son también adecuadas. Estos ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitador.

Los anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión del anticuerpo se pueden producir en bacterias, en especial cuando la glicosilación y la función efectora de Fc no se necesitan, lo que ocurre por ejemplo cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en E. coli es más rápida y rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, U.S. 5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.) y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.), que describen las secuencias de señal y la región de iniciación de la traducción (TIR) para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, se aísla el anticuerpo de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteínas A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse de forma similar al proceso de purificación de anticuerpos expresados en, *por ejemplo*, células CHO.

Además de procariotas, los microbios eucarióticos como los hongos filamentosos o levadura también son aptos como huéspedes para expresión o clonación de los vectores de codificación del anticuerpo de unión a IgE. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura habitual del pan, es la que más se utiliza entre los microorganismos huésped eucarióticos inferiores. No obstante, otros géneros, especies y cepas de utilidad en la presente memoria descriptiva están disponibles, como por ejemplo, *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes *Kluyveromyces* tales como *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906), *K . thermotolerans*, y *K. marxianus; yarrowia* (patente europea 402.226); *Pichia pastoris* (patente europea 183.070); *Candida; Trichoderma reesia* (patente europea 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium*, y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger.*

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo de unión a IgE glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Algunos ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de insectos y plantas. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped permisivas de insectos procedentes de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles diversas cepas de virus para transfección, por ejemplo, la variante L-1 del NPV *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV *Bombyx mori* y estos virus se pueden usar como el virus en la presente memoria descriptiva, de conformidad con la presente invención, en concreto para la transfección de las células *Spodoptera frugiperda.*

Los cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también pueden utilizarse como huéspedes.

No obstante, el mayor interés se ha centrado en las células de vertebrados, y la propagación de éstas en cultivos (histocultivo) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón del mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *y col., J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de crías 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 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 cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (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; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo de unión a IgE y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(8) Cultivo de las células huésped

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo de unión a IgE de esta invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercialmente disponibles como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), Patentes de Estados Unidos n°s. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar cuando sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario, en concentraciones adecuadas, que los expertos en la materia conozcan. Las condiciones del cultivo, como la temperatura o el pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

(9) Purificación del anticuerpo

Al utilizar técnicas recombinantes, se puede producir el anticuerpo intracelularmente, en el espacio periplasmático, o se puede secretar directamente en el medio de cultivo. Si el anticuerpo se produce a nivel intracelular, como primer paso, los residuos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *y col., Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para el aislamiento de anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli.* Puede resumirse diciendo que la pasta celular se funde en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluorido (PMSF) en unos 30 minutos. Los residuos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero, por lo general, utilizando un filtro para concentración de proteínas comercializado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las fases anteriores se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF para inhibir la proteolisis y antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes espontáneos.

La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo esta última la técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo de cualquier domino Fc de la inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas humanas 1, 2 ó 4 (Lindmark y col., *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la 3 humana (Guss et al., *EMBO J.* 5:15671575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une es, sobre todo, agarosa, pero también están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, New Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, dependiendo del anticuerpo que quiera recuperarse, otras técnicas para purificar proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

Siguiendo cualquiera de las fases preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes puede estar sujeta a cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando una solución de elución a un pH entre 2,5 y 4,5, preferiblemente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, entre 0-0,25M aproximadamente).

B. Preparación de anticuerpos

1) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen generalmente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante a una proteína que es inmunogénica en la especie que se está inmunizando, *por ejemplo*, hemocianina de Keyhole Limpet (HKL), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$, o $R^1N=C=NR$, en donde R y R^1 son grupos alquílicos independientemente menores. Entre los adyuvantes que se pueden emplear están adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por un experto en la materia sin excesiva experiementación.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos, o derivados al combinar, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectar la solución intradérmicamente en múltiples lugares. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples lugares. Entre siete y catorce días más tarde, se extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta obtener los niveles adecuados de titulación. Los conjugados también se pueden hacer en cultivos celulares recombinantes como fusiones proteicas. Asimismo, los agentes agregantes, como el alumbre, son adecuados para intensificar la respuesta inmunológica.

2) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, *es decir*, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de formación natural y/o modificaciones postraduccionales (por ej., isomerizaciones, admidaciones) que pueden estar presentes en cantidades insignificantes. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de que no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, pueden conseguirse anticuerpos monoclonales por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler *y col., Nature,* 256:495 (1975), o con métodos del ADN recombinante (Patente de Estados Unidos N.° 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal anfitrión apropiado, como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. Después, los linfocitos se fusionan con las células de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como por ejemplo

polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986).

El agente inmunizante por lo general incluirá la proteína antigénica o una variante de fusión de la misma. Por lo general, se utilizan bien linfocitos de la circulación periférica ("PBL") si se desean células de origen humano o células de bazo o células de ganglios linfáticos, si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press (1986), págs. 59-103.

Las líneas de células inmortalizadas son habitualmente células transformadas de mamíferos, en especial, células de mieloma de roedor, bovinas o de origen humano. Por lo general, se emplean líneas de células de mieloma de ratón o rata. Por lo tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales no contienen la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que son sustancias que previenen el crecimiento de células deficitarias en HGPRT.

Las células de mieloma inmortalizadas preferentes son aquéllas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles estables de producción de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio como el HAT. Entre éstas, se prefieren las líneas de mieloma murino, como aquéllas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, en San Diego (California, EE.UU.), y las células SP-2 (y derivados, por ejemplo, las X63-Ag8-653), disponibles en el American Type Culture Collection, en Manassas, Virginia EE. UU. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales directamente contra el antígeno deseado. Preferentemente, la afinidad y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión in vitro, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en el campo. Por ejemplo, la afinidad de unión puede determinarse mediante el análisis Scatchard de Munson *y col., Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de identificar que las células de hibridoma producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y pueden crecer mediante métodos estándar (Goding, *citado anteriormente*). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína-A-sefarosa, la cromatografía de hidroxilapatita, la electroforesis en gel, la diálisis o la cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden también elaborarse mediante métodos de ADN recombinante, como los escritos en la Patente de Estados Unidos número 4.816.567, y como se describe anteriormente. Se aísla el ADN que codifica los anticuerpos monoclonales y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan a células huésped como por ejemplo células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen la proteína de inmunoglobulina, para sintetizar anticuerpos monoclonales en dichas células huésped recombinantes. Los artículos de reseña sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifican el anticuerpo incluyen Skerra *y col.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

En otra forma de realización, los anticuerpos se pueden aislar de librerías de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *y col.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *y col.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Las publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante combinación de cadenas (Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como también la infección combinatoria y la recombinación in vivo como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpo monoclonal tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia de codificación de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567, y Morrison, y col., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido, que no sea inmunoglobulina, a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina. Típicamente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o los dominios variables de un punto de combinación con el antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un punto

de combinación con el antígeno con especificidad para un antígeno y otro punto de combinación con el antígeno con especificidad para otro antígeno diferente.

Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente pueden ser monovalentes, cuya preparación es bien conocida en el campo. Por ejemplo, un método entraña la expresión recombinante de una cadena ligera de inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca, por lo general, en cualquier punto de la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos pertinentes de cisteína pueden sustituirse por otro residuo aminoacídico o son eliminados para evitar la reticulación. También sirven los métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en especial de fragmentos Fab, puede lograrse usando técnicas rutinarias conocidas en el campo.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden preparase *in vitro* mediante métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos en que intervienen agentes reticulantes. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse empleando una reacción de intercambio de disulfuros o formando una unión de tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin están iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

3) Anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos de la invención pueden comprender también anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a un antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región de determinación de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata o el conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni la CDR importada o las secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente al menos un dominio variable y típicamente dos dominios variables, en los que todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR correspondan a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR sean las de una secuencia consensual de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá, además, de forma óptima, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Jones *y col., Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann *y col., Nature* 332: 323-329 (1988) y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992).

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el campo. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se

conocen generalmente como residuos "importados" que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente a través del método de Winter y colaboradores (Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), o al sustituir las secuencias CDRs o CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. n° 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR se sustituyen por residuos de puntos análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para realizar los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad. De acuerdo con el procedimiento llamado "el más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se coteja con toda la librería de secuencias conocidas de dominios variables humanos. La secuencia humana que se parece mí¡s a la del roedor se acepta, entonces, como la estructura humana (FR) para el anticuerpo humanizado. Sims *y col., J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *y col., J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987). Otro procedimiento utiliza una estructura concreta derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados distintos. Carter *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *y col., J. Immunol.*, 151:2623 (1993).

Es también importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo el procedimiento preferente, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y las humanizadas. Los modelos tridimensionales de la inmunoglobulina están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que los residuos probablemente desempeñan en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad por el/los antígeno(s) diana(s). En general, los residuos CDR influyen directamente y en mayor medida en la unión al antígeno.

Se contemplan diversas formas del anticuerpo humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo IgG1 intacto.

4) Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ej., ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de producir un completo repertorio de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la cadena pesada del anticuerpo que se une a la región del gen (J_H) en ratones quiméricos y en líneas germinales de ratones mutantes ocasiona la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en la línea germinal de dicho ratón mutante ocasionará la producción de anticuerpos humanos frente al antígeno presentado. Consultar, *por ej.*, Jakobovits *y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *y col., Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *y col., Year in Immuno.*, 7:33 (1993); Patentes de los Estados Unidos núms. 5.591.669 y WO 97/17852.

Optativamente, puede usarse la tecnología de presentación de fago para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. McCafferty *y col.*, *Nature* 348:552-553 (1990); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227: 381 (1991). De acuerdo con esta técnica, los genes de los dominios V de los anticuerpos se clonan dentro de la estructura en un gen proteínico de revestimiento o bien mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de una sola fila del genoma del fago, las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita alguna de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos puede realizarse en una serie de formatos, que se revisan en, por ej, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Curr. Opin Struct. Biol.* 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la reproducción de imágenes de fagos. Clackson *y col.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron un conjunto de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña librería combinatorial de genes V aleatoria derivada de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un gran conjunto de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). Consultar también las Patentes de los Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

Las técnicas de Cole y col. y de Boerner y col. también se encuentran disponibles para la preparación de los anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991). De manera similar, los anticuerpos humanos también pueden obtenerse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p.ej., ratones cuyos genes de inmunoglobulina endógena han sido inactivados parcial o totalmente. Tras la prueba de provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, muy parecida en todos sus aspectos a lo que puede verse en

humanos, que incluye el reordenamiento, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos de los genes. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. N°s. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *y col., Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13 (1994), Fishwild *y col., Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996), Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996) y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Por último, los anticuerpos humanos también pueden generarse *in vitro* mediante células B activadas (véanse las patentes de EE.UU. N° 5.567.610 y 5.229.275).

5) Fragmentos de anticuerpos

En determinadas circunstancias, resulta útil utilizar fragmentos de anticuerpos en vez de anticuerpos completos. El tamaño menor de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede brindar mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., *J. Biochem. Biophys. Method.* 24:107-117 (1992); y Brennan y col., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células anfitrión recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y scFv pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las librerías de fagos descritas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otro método, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente de los cultivos de células huésped recombinantes. En la Patente de EE.UU. N° 5.869.046 se describen Fab y $F(ab')_2$ con aumento en semivida in vivo. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Consultar el documento WO 93/16185; la patente de los Estados Unidos N° 5.571.894; y la patente de los Estados Unidos N° 5.587.458. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", por ej., tal y como se describe en la patente de los Estados Unidos N° 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

6) Tratamiento con profármaco mediado por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidil, véase el documento WO 81/01145) en un antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo pueda convertir en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, entre otras, glicosidasa, oxidasa de glucosa, lisozima humana, glucoronidasa humana, fosfatasa alcalina, útil para convertir los profármacos que contienen fosfatasa en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosine no tóxica en el antineoplásico, 5-fluorouracil; proteasas, como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (por ej., carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácido; enzimas que escinden carbohidratos, como β-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir fármacos derivados de β-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amino de grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en el sector como "abzimas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos libres activos (véase, por ejemplo, Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados de anticuerpo y abzima se pueden preparar como se describe en la presente memoria descriptiva para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas anteriores se pueden unir covalentemente al polipéptido o a anticuerpos aquí descritos mediante técnicas bien conocidas en el campo, como el uso de los agentes reticulantes heterobifuncionales mencionados previamente. Alternativamente, las proteínas de fusión que incluyen al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la invención enlazado al menos a una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el campo (véase, por ejemplo, Neuberger y col., *Nature*, 312: 604-608 (1984)).

7) Anticuerpos biespecíficos y poliespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes, que incluyen los de la misma proteína o de otra. Optativamente, un brazo puede armarse para unirse al antígeno diana, y otro brazo puede combinarse con un brazo que se una con una molécula activadora de un leucocito, como una molécula receptora de células T (*por ej.*, CD3), o receptores Fc para IgG (FcγR) como FcγR1 (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera de enfocar y localizar mecanismos de defensa celulares en la células de expresión de antígenos dianas. Dichos anticuerpos pueden derivarse a partir de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan el antígeno diana. Dichos anticuerpos cuentan con un brazo que se une con el antígeno deseado y otro brazo que se une con el agente citotóxico (por ej., saporina, antiinterferón-a, alcoloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno de isótopo radioactivo). Ejemplos de anticuerpos biespecíficos conocidos incluyen anti-ErbB2/anti-FcgRIII

(WO 96/16673), anti-ErbB2/anti-FcgRI (Patente de EE.UU . 5,837,234), anti-ErbB2/anti-CD3 (Patente de EE.UU. 5.821.337).

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en que las dos cadenas tienen distintas especificidades. Millstein *y col., Nature*, 305:537-539 (1983). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una posee la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. En el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se revelan procedimientos similares.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan en las secuencias de domino constante de la inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contengan el punto necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, de cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan a un organismo huésped adecuado. Esto mantiene la gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de tres fragmentos polipéptidos en realizaciones en donde las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación de dos o de las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión es de al menos de dos cadenas de polipéptidos en resultados con proporciones iguales en rendimientos altos o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de las moléculas biespecíficas proporciona un método de fácil separación. Este método se desveló en el documento WO 94/04690. Para obtener más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, consúltese, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210(1986).

Según otro método descrito en WO 96/27011 o en la patente de los Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante del anticuerpo.

En este procedimiento, una o más cadenas laterales cortas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales más largas (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) larga(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales largas de aminoácidos por cadenas más cortas (*por ej.* alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero sobre los productos finales no deseados como los homodímeros.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descritos en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse utilizando una unión química. Brennan y col., *Science*, 229: 81 (1985) describe un procedimiento mediante el cual los anticuerpos intactos se escinden por vía proteolítica para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen con la presencia de arsenito de sodio del agente que forma complejos con el ditiol para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte entonces al derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y unirse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describe la producción de moléculas $F(ab')_2$ de anticuerpos biespecíficos completamente humanizados. Cada fragmento Fab' se secretó por separado a partir de E. coli y se sometió a un emparejamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. Por lo tanto, el anticuerpo biespecífico formado era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito varias técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *y col.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, después, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) ha ofrecido un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a aparearse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando, por lo tanto, dos lugares de unión del antígeno. También se ha informado otra estrategia para realizar fragmentos de

anticuerpos biespecíficos/bivalentes mediante la utilización de dímeros Fv de cadena única (sFv). Consultar Gruber *y col., J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Ejemplos de anticuerpos pueden unirse a dos epítopos diferentes de una molécula determinada. Alternativamente, un brazo antiproteína se puede combinar con un brazo que se una a una molécula activadora en un leucocito, como una molécula receptora de células T *por ej.* CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc para IgG FcγR), como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa la proteína en particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresan una proteína en particular. Dichos anticuerpos cuentan con un brazo que se une a proteínas y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelator de radionúclido, como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une con la proteína de interés y posteriormente se une con el factor de tejido (TF).

8) Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más de prisa que un anticuerpo bivalente por una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más puntos de unión al antígeno. El dominio preferente de dimerización comprende una región Fc o una región bisagra o consiste en ellas. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminal a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente en la presente memoria descriptiva comprende entre tres y ocho sitios de unión al antígeno aproximadamente, aunque preferentemente cuatro, o consiste en esos sitios. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente dos cadenas de polipéptidos) en la que la cadena o cadenas de polipéptidos comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, donde VD1 es un primer dominio de variable, VD2 es un segundo dominio de variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan una aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas de polipéptidos pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de la región Fc o VH-CH1-VH-CH1-cadena de la región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva comprende, además, preferentemente, al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, puede comprender entre aproximadamente dos y ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de la cadena ligera considerados en esta memoria descriptiva comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, un dominio CL.

9) Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede unir a la avidina o a la biotina. Se ha propuesto usar dichos anticuerpos, por ejemplo, teniendo como objetivo las células del sistema inmunológico de células no deseadas, patente de EE.UU. 4.676.980, y para el tratamiento de la infección por VIH. WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 0308936. Se contempla que los anticuerpos puedan preparase *in vitro* mediante métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos en que intervienen agentes de enlaces cruzados. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse empleando una reacción de intercambio de disulfuros o formando una unión de tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin están iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los que se señalan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4.676.980. Pueden elaborarse anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método reticulantes que resulte práctico. Los agentes reticulantes adecuados se conocen bien en la materia y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

10) Ingeniería de la función efectora

Tal vez se desee modificar el anticuerpo de la invención en lo referente a la función efectora, por ejemplo, para incrementar la citotoxicidad con mediación celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr al introducir uno o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo. De manera alternativa o adicional, un(os) residuo(s) de cisteína se puede(n) introducir en la región Fc, por lo tanto permitiendo la formación de un puente disulfuro entre las cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener mayor capacidad de internalización y/o mayor muerte celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Consultar Caron y col., *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B., *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando agentes de enlaces cruzados heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede diseñar un anticuerpo con dobles regiones Fc y se puede, por lo tanto, potenciar la lisis por complemento y las capacidades ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989).

Para incrementar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo (especialmente un fragmento del anticuerpo) tal como se describe en la patente de los Estados Unidos 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítopo de unión a receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ej., IgG_1, IgG_2, IgG_3, o IgG_4) que es responsable de incrementar la semivida sérica *in vivo* de la molécula IgG.

11) Inmunoconjugados

La invención también se refiere a inmunoconjugados o conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC), que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico como por ejemplo un agente quimioterapéutico, una toxina (*por ejemplo*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, animal o vegetal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (*es decir*, un radioconjugado). Dichos ADC deben tener un perfil de seguridad aceptable.

El uso de conjugados de anticuerpos con fármacos para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, *por ejemplo*, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos, *Anticancer Research*, 19:605-14(1999); Niculeascu-Duvaz y Springer, *Adv. Drug Del. Rev.* 26: 151-72 (1997); patente de EE.UU. N° 4.975.278) teóricamente permite la administración delimitada del fármaco a tumores, y la acumulación intracelular del mismo, donde la administración sistemática de estos agentes con fármacos no conjugados puede resultar en inaceptables niveles de toxicidad tanto para las células normales, como para las células tumorales que se intenta eliminar (Baldwin y col., *Lancet,* 603-05 (1986); Thorpe, (1985) *Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,* en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera y col., (eds), págs. 475-506). Se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Ambos anticuerpos, monoclonales y policlonales, han sido descritos como útiles en estas estrategias (Rowland y col., *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986)). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorrubicina, metotrexato y vindesina. Entre las toxinas empleadas en anticuerpos conjugados con toxinas se encuentran las toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, toxinas vegetales como la ricina, toxinas de pequeñas moléculas como la geldanamicina (Mandler y col., (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-81 (2000); Mandler y col., *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-28 (2000); Mandler y col., *Bioconjugate Chem.* 13: 786-91 (2002))), maitansinoides (Patente Europea EP 1391213; Liu y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8618-23 (1996)) y caliqueamicina (Lode y col., *Cancer Res.* 58:2928 (1998); y Hinman *y col., Cancer Res.* 53:3336-42 (1993)). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión de tubulina, la unión de ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con grandes anticuerpos o ligandos receptores de proteínas.

Se han descrito anteriormente los agentes quimoterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados, e incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina, vinblastina, adriamcina y 5-fluorouracilo.

Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modecina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de la Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de la Saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y el

tricotecenos. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos están ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, and ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de unión a proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaráldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO 1994/11026.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se realizan utilizando una variedad de agentes de emparejamiento con una proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Consultar el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación de la droga citotóxica en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil al ácido, un conector sensible a la peptidasa, un conector dimetílico o un conector que contenga disulfuro (Chari *y col., Cancer Res.*52:127-131 (1992)).

Además, las toxinas de moléculas pequeñas, como calicheamicina, maitansina (patente de EE.UU. 5.208.020), tricoteno y CC1065 también se contemplan como toxinas conjugables para uso en la formulación de la invención. En una realización, el anticuerpo de longitud completa o los fragmentos de unión a antígenos del mismo pueden conjugarse a una o más moléculas de maitansinoide (por ej., entre alrededor de 1 y 10 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo). Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. Se han descrito los maitansinoides, aislados de fuentes naturales o preparados sintéticamente, incluida la maitansina, el maitansinal y derivados y análogos de éstos, por ej., patente de EE.UU. número 5.208.020 y referencias aquí citadas (ver col. 2, línea 53 a col. 3, línea 10) y patentes de EE.UU. 3.896.111 y 4.151.042. También se describen métodos de preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide en la patente de EE.UU. 5.208.020. En una realización preferida, se une un maitansinoide al anticuerpo a través de un disulfuro u otro grupo de unión que

contenga sulfuro. La maitansina, por ejemplo, se puede convertir a May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y hacer reaccionar con un anticuerpo modificado para generar un inmunocongujado de maitansinoide-anticuerpo. Chari *y col.*, *Cancer Res.* 52: 127-131 (1992). El anticuerpo puede modificarse mediante métodos conocidos y el anticuerpo que contenga grupos tioles libres o protegidos se hace entonces reaccionar con un disulfuro que contiene maitansinoide para producir un conjugado. La citotoxicidad del conjugado anticuerpo-maitansinoide puede medirse *in vitro* o *in vivo* mediante métodos conocidos y determinar el IC_{50}.

La calicheamicina es otro inmunoconjugado de interés. La familia de antibióticos de la calicheamicina es capaz de producir la ruptura del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Los análogos estructurales de la calicheamicina que se pueden utilizar incluyen, entre otros, γ_1^I, $\alpha\pm_2^I$, $\alpha\pm_3^I$, N-acetil-$\gamma^3{}_1^I$, PSAG y $\theta,_1^I$ (Hinman *y col.*, Cancer Res. 53:3336-3342 (1993) y Lode y col., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)). Otro fármaco antineoplásico con el que es posible conjugar el anticuerpo es el QFA, que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acciones y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por el anticuerpo potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Los inmunoconjugados formados entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ej., una ribonucleasa o endonucleasa de ADN, como una deoxirribonucleasa, ADNasa) también se contemplan.

En los conjugados de anticuerpos con fármacos (ADC) de la invención, un anticuerpo (Ab) se conjuga a una o más porciones de un fármaco (D), por ejemplo, de 1 a 20 porciones de fármaco aproximadamente por anticuerpo, a través de un enlazador (L). Los ADC de la formula I se pueden preparar por varios medios, empleando reacciones químicas orgánicas, condiciones y reactivos conocidos por los expertos, como: (1) una reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un agente enlazador bivalente, para formar un Ab-L, mediante una unión bivalente, seguida de la reacción con una fracción del fármaco D; y (2) una reacción de un grupo nucleofílico de una fracción del fármaco con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico del anticuerpo.

$$Ab–(L–D)_p \qquad \text{Fórmula I}$$

Los grupos nucleofílicos en los anticuerpos incluyen: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amino de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos amino o hidroxilo de azúcares donde el anticuerpo es glicosilado. Los grupos amino, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar uniones covalentes con grupos electrofílicos en las porciones del enlazador y los reactivos enlazadoras, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos, y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos. Ciertos anticuerpos contienen bisulfuros de intercadena reducible, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos mediante conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor como el DTT (ditiotreitol). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleofilos tiol reactivos. Los grupos

nucleofílicos adicionales pueden introducirse en los anticuerpos a través de la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), lo que da lugar a la conversión de una amina en un tiol.

Los conjugados de anticuerpos de la invención con fármacos también pueden producirse mediante la modificación del anticuerpo para introducir porciones electrófilas, las cuales pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o el fármaco. Las azúcares de los anticuerpos glicosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de periodato, a fin de formar grupos cetonas o aldehídos, los cuales pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o las fracciones del fármaco. Los grupos resultantes de imina base de Schiff pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ej. mediante los reactivos de hidruro de boro para formar enlaces amina estables. En una forma de realización, la reacción de la porción carbohidratada de un anticuerpo glicosilado, ya sea con galactosa oxidasa o con metaperiodato de sodio, puede producir grupos de carbonilo (aldehídos y cetonas) en la proteína que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Domen y col., *J. Chromatog.*, 510: 293-302 (1990)). En otra forma de realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina N-terminal pueden reaccionar con metaperiodato de sodio, lo que da lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, *Bioconjugate Chem.* 3:138-46 (1992): EE.UU. 5.362.852). Este aldehído se puede hacer que reaccione con un fragmento de fármaco o un nucleófilo enlazador.

Del mismo modo, los grupos nucleofílicos en una fracción del fármaco incluyen los siguientes compuestos: los grupos amino, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y aril-hidracida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores, que incluyen: (i) ésteres activos como los ésteres NHS, los ésteres HOBt, haloformos, y haluro de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo como las haloacetamidas; y (iii) aldehídos, cetonas, carboxilo y grupos maleimidos.

Alternativamente, es posible realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico, por ej. mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea que estén adyacentes una a otra o separadas por una región que codifica un péptido de enlace que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado anticuerpo-receptor, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Los ADC de la presente memoria descriptiva se preparan opcionalmente con reactivos reticulados: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato), que se comercializan (por ejemplo, por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL,).

El anticuerpo puede también conjugarse con un átomo altamente radioactivo. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211}, Bi^{212}, I^{131}, In^{131}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, P^{32} y Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99} o I^{123}, o un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (conocida también como imágenes obtenidas mediante resonancia magnética, irm), como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden incorporarse marcadores radioctivos o de otro tipo al conjugado utilizando las formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, fluorina-19 en vez de hidrógeno. Etiquetas como Tc^{99} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} e In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 puede unirse a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN se puede utilizar para incorporar yodo-123 (Fraker y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57 (1978). Otros métodos para conjugar radionúclidos se describen en "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy," (Chatal, CRC Press 1989).

Alternativamente, se puede realizar una fusión de proteínas que contengan el anticuerpo y el agente citotóxico mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea adyacente uno a otro o en forma separada por una región que codifica un péptido de enlace, el cual no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra forma de realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) y actuar previamente contra el tumor, donde se administra al paciente el conjugado anticuerpo-receptor, luego, se elimina de la circulación el conjugado no unido, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

12) Otras modificaciones de secuencias de aminoácidos

Se contemplan la(s) modificación(es) de la secuencia de aminoácidos descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se puede querer mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios nucleótidos adecuados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis del péptido. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de residuos dentro de las secuencias del aminoácido del anticuerpo y/o inserciones en esos residuos y/o sustituciones de los mismos. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios aminoacídicos también pueden alterar los procesos postraduccionales del anticuerpo, como por ejemplo cambiar el número o la posición de los lugares de glicosilación.

Un procedimiento útil para identificar ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son ubicaciones preferidas para la mutagénesis se llaman "mutagénesis de barrido de alanina" tal como lo

describe Cunningham y Wells en *Science*, 244:1081-1085 (1989). Aquí, se identifica un residuo o un grupo de residuos dianas (por ej. residuos cargados como por ejemplo arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por aminoácidos cargados neutral o negativamente (preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Estas ubicaciones de los aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan al introducir más u otras variantes en, o por, los sitios de sustitución. Por lo tanto, a pesar de que el lugar para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación per se no se necesita predeterminar. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un lugar dado, se realiza el barrido de alanina o mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes expresadas del anticuerpo se monitorizan para detectar la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxi terminal que abarcan desde un residuo hasta polipéptidos que contienen cien o más de residuos, así como inserciones dentro de la secuencia de uno o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones en los extremos terminales son un anticuerpo con un residuo metionil en el extremo N terminal o el anticuerpo fusionado a un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula del anticuerpo incluyen la fusión del extremo N o terminal o C del anticuerpo a una enzima (por ej. para ADEPT) o un polipéptido que aumente la semivida sérica del anticuerpo.

Otro tipo de variante es una variante de sustitución aminoacídica. Estas variantes reemplazan al menos un residuo de aminoácidos en la molécula del anticuerpo por un residuo diferente. Los lugares de mayor interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero las alteraciones FR también se contemplan. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla A en el epigrafe "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla A, o como se describe a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se pueden monitorizar.

TABLA A
Sustituciones de aminoácidos

Residuo original	**Sustituciones ejemplares**	**Sustituciones preferidas**
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg

Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna vertebral del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el lugar diana, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que aparecen naturalmente se dividen en grupos basándose en sus propiedades comunes de las cadenas laterales:

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) acídicos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que tiene influencia en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase.

Cualquier residuo de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar interuniones atípicas. A la inversa, la(s) unión(es) de cisteína se pueden agregar al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en donde el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, como por ejemplo un fragmento Fv).

Un tipo de variante de sustitución particularmente preferido implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ej. un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para mayor desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo parental desde el cual se generaron. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución supone la maduración de afinidad utilizando una representación en imágenes de fagos. De manera resumida, varios lugares de región hipervariable (por ej. 6-7 lugares) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada lugar. Las variantes del anticuerpo generadas de este modo se presentan de

forma monovalente, a partir de partículas de fagos filamentosos, como fusiones con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se monitorizan para detectar su actividad biológica (por ej. afinidad de unión) como se desvela en esta memoria descriptiva. Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se pueden realizar barridos de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el IgE. Dichos residuos de contacto y residuos adyacentes son candidatos a la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez que se generan dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a monitorización tal como se describe en la presente memoria descriptiva y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para mayor desarrollo.

Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Alterar significa borrar uno o más residuos glucídicos encontrados en el anticuerpo, y/o agregar uno o más lugares de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

La glicosilación de anticuerpos es generalmente por enlace tipo N o tipo O. Por enlace tipo N se refiere al anclaje del residuo glucídico en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, en donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos del residuo glucídico a la cadena lateral de asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un punto de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace tipo O se refiere al anclaje de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente al alterar la secuencia del aminoácido para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descrita anteriormente (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo N). La alteración también se puede realizar además mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para lugares de glicosilación unidos por enlace tipo O).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IgE se preparan a través de diversos métodos conocidos en la materia. Éstos incluyen, aunque sin limitarse a, el aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que aparezcan naturalmente) o la preparación por mutagénesis con mediación de oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis dirigida mediante PCR y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-IgE.

13) Otras modificaciones de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención pueden modificarse aún más a fin de que contengan fracciones no proteicas adicionales que son conocidas en el campo y se encuentran disponibles.

Preferiblemente, las fracciones adecuadas para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de los polímeros solubles en agua incluyen, aunque sin limitarse a, los siguientes componentes: polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero anhídrido etileno/maleico, poliaminoácidos (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, óxido de prolipropileno/copolímeros de óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinilo, y mezclas de los mismos. Es posible que el polietilenglicol propionaldehido ofrezca ventajas en la elaboración, dada su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no. La cantidad de polímetros adheridos al anticuerpo puede variar y, si se une más de un polímero, los polímeros pueden ser las mismas o diferentes moléculas. Generalmente, la cantidad y/o clase de polímeros utilizados para la derivatización puede determinarse en función de ciertas consideraciones, como las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado del anticuerpo será utilizado en un tratamiento en condiciones definidas, etc. Dichas técnicas y otras formulaciones adecuadas se divulgan en *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20a Ed., Alfonso Gennaro, Ed., Philadelphia College of Pharmacy and Science (2000).

C. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas se preparan para su conservación mediante la mezcla del ingrediente activo que tenga el grado deseado de pureza con moléculas vehículo, excipientes o estabilizantes opcionales farmacológicamente aceptables (*Remington*: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20a Ed., Lippincott Williams & Wiklins, Pub., Gennaro Ed., Philadelphia, PA 2000). Las moléculas vehículo, los excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores con las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes como ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito de sodio; preservantes, isotonicificantes, estabilizantes, complejos metálicos (por ej., complejos de proteínas y Zn); agentes quelantes, como EDTA y/o surfactantes no iónicos.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, tomando como referencia las secuencias de la región variable de un anticuerpo, los fragmentos de anticuerpo o incluso las moléculas peptídicas pueden diseñarse para retener la capacidad de unión de la secuencia de la proteína objetivo. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, *por ej.*, Marasco *y col.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 [1993]).

Los tampones se usan para controlar el pH en un rango que optimice la efectividad terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Se cuenta con tampones preferentemente en concentraciones de entre alrededor de 50 mM y alrededor de 250 mM. Entre los agentes de tamponeado para usar con la presente invención se cuentan ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de

éstos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Además, los tampones pueden consistir en sales de histidina y trimetilamina, como Tris.

Se añaden preservantes para retardar el crecimiento microbiano, y por lo general están presentes en un rango de 0,2% - 1,0% (p/v). Los preservantes adecuados para el uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbenzilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalkonio (*por ej.*, cloruro, bromuro, ioduro), cloruro de benzetonio; timerosal, fenol, alcohol butilo o benzilo; parabenos alquílicos como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y *m*-cresol.

Se cuenta con agentes de tonicidad, conocidos en ocasiones como "estabilizadores", para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se usan con biomoléculas grandes y cargadas, como las proteínas y los anticuerpos, con frecuencia se les denomina "estabilizadores", ya que pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, con lo que disminuyen la posibilidad de interacciones inter e intra moleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presenten en cualquier cantidad entre 0,1% a 25% por peso, de preferencia de 1 a 5%, tomando en consideración las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad preferidos incluyen los alcoholes de azúcar polihídricos, de preferencia alcoholes de azúcar trihídricos o superiores, como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Otros agentes excipientes incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes elementos: (1) agentes aglutinantes, (2), potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizadores y (4) agentes que prevengan la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alcoholes de azúcar polihídricos (indicados anteriormente); aminoácidos como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, *etc.*; alcoholes de azúcar o azúcares orgánicas como sucrosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinisitosa, mioinisitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (*por ej.*, inositol), poletilenglicol; agentes reductores con contenido de azufre, como urea, glutationa, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, como albúmina sérica humana, albúmina sérica bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, como polivinilpirrolidona; monosacáridos (*por ej.*, xilosa, manose, fructosa, glucosa; disacáridos (por ej., lactosa, maltosa, sucrosa); trisacáridos como rafinosa; y polisacáridos como dextrina o dextrán.

Se cuenta con detergentes o surfactantes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica de la agregación inducida por la agitación, lo que también permite a la formulación estar expuesta a un esfuerzo cortante en la superficie sin causar la desnaturalización de la proteína o del anticuerpo terapéutico activo. Se cuenta con surfactantes no iónicos en orden de unos 0,05 mg/ml a unos 1,0 mg/ml, preferentemente de unos 0,07 mg/ml a unos 0,2 mg/ml.

Los surfactantes no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 40, 60, 65, 80, *etc.*), polioxámeros (184, 188, *etc.*), polioles PLURONIC®, TRITON®, monoéteres de polioxietilensorbitán

(TWEEN®-20, TWEEN®-80, *etc.*), lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, éster de ácidos grasos de sucrosa, metilcelulosa y carboximeilcelulosa. Entre los detergentes aniónicos que pueden usarse se cuentan laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Los detergentes catiónicos incluyen cloruro de benzalconio o cloruro de benzetonio.

A fin de usar las formulaciones en administración *in vivo*, éastas deben ser estériles. La formulación puede hacerse estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas de la presente memoria descriptiva se suelen colocar en un acondicionamiento con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa con una solución para administración intravenosa o un vial con un tapón que se puede perforar con una aguja hipodérmica.

La ruta de administración está de acuerdo con los métodos conocidos y aceptados, como mediante bolo simple o múltiple o infusión durante un período de manera adecuada, *por ej.*, inyección o infusión mediante rutas subcutáneas, intravenosas, intraperitoneales, intramusculares, intraarteriales, intralesionales o intrarticulares, administración tópica, inhalación, o a través de medios de liberación sostenida o de liberación extendida.

La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Optativamente, o además de esto, la composición puede consistir en un agente citotóxico, citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que sean eficaces para el fin que se pretende.

Los ingredientes activos también se pueden conservar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de presentación de medicamentos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18a edición, *citado anteriormente*.

La estabilidad de las proteínas y de los anticuerpos descritos aquí puede potenciarse a través del uso de "sales de metales polivalentes solubles en agua". Ejemplos incluyen Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+}, Al^{2+} y Al^{3+}. Ejemplos de aniones que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes incluyen los que se forman a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20°C) de al menos 20 mg/ml, optativamente al menos 100 mg/ml, optativamente al menos 200 mg/ml.

Entre los ácidos inorgánicos adecuados que pueden usarse para formar "sales metálicas polivalentes solubles en agua" se cuentan los ácidos clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiociánico y fosfórico. Entre los ácidos orgánicos adecuados que pueden usarse se cuentan el ácido carboxílico alifático y los ácidos aromáticos. En esta definición, los ácidos alifáticos pueden describirse como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o no saturados (por ej., ácidos mono-, di- y tricarboxílicos alifáticos). Por ejemplo, ejemplos de ácidos monocarboxílicos en esta definición incluyen los ácidos

monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propriónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico pelargónico y capriónico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} no saturados acrílico, propriólico metacrílico, crotónico e isocrotónico. Ejemplos de ácidos dicarboxílicos incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} no saturados incluyen los ácidos maleico, fumárico, citracónico y mesacónico. Ejemplos de ácidos tricarboxílicos incluyen los ácidos tricarboxílicos C_{2-9} saturados tricarbalílico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Además, los ácidos carboxílicos de esta definición pueden contener también uno o dos grupos hidroxílicos que forman ácidos hidroxicarboxílicos. Ejemplos de ácidos hidroxicarboxílicos incluyen los ácidos glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos de esta definición incluyen los ácidos benzoico y salicílico.

Entre las sales de metales polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que pueden usarse para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de esta invención se cuentan, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (*por ej.*, cloruro de zinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos (por ej., acetato de calcio, acetato de zinc, proprionato de calcio, glicolato de zinc, lacatato de calcio, lactato de zinc y tartrato de zinc); y (3) las sales metálicas de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (*por ej.*, benzoato de zinc) y salicilatos.

D. Métodos de tratamiento:

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que se tratará, tal como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, si el agente se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del médico tratante. El agente se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos.

Un método preferido de tratamiento es aquel de trastornos mediados por IgE. Los trastornos mediados por IgE incluyen trastornos atópicos, que se caracterizan por una propensión heredada a responder inmunológicamente a muchos antígenos inhalados e ingeridos de la naturaleza y a la producción continua de anticuerpos de IgE. Entre los trastornos atópicos específicos se cuenta el asma alérgica, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica y la gastroenteropatía alérgica. Los pacientes atópicos sufren a menudo de múltiples alergias, lo que quiere decir que tienen anticuerpos de IgE y síntomas contra muchos alergenos ambientales, como polen, hongos (por ej., moho), desechos de animales e insectos y ciertos alimentos.

No obstante, los trastornos asociados con niveles elevados de IgE no se limitan a aquellos con etiología heredada (atópica). Otros trastornos asociados con niveles elevados de IgE, que parecen ser mediados por IgE y que son tratables con las formulaciones de la presente invención, incluyen hipersensibilidad (*por ej.*, hipersensibilidad anafiláctica), eczema, urticaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasíticas, síndrome de híper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, alinfoplasia tímica, mieloma de IgE y reacción de injerto versus anfitrión.

La *rinitis alérgica*, conocida también como rinoconjuntivitis alérgica o fiebre del heno, es la manifestación más común de una reacción atópica de alergenos inhalados, cuya gravedad y duración guarda a menudo correlación con la intensidad y el tiempo de exposición al alergeno. Es una enfermedad crónica que puede aparecer a cualquier edad, pero la irrupción es por lo general durante la niñez o la adolescencia. Un ataque típico consiste en rinorrea acuosa profusa, estornudos paroxismales, obstrucción nasal y picazón de la nariz y el paladar. El goteo posnasal causa también garganta irritada, carraspera y tos. Puede haber también síntomas de blefaroconjuntivitis alérgica, con picazón intensa de las conjuntivas y los párpados, enrojecimiento, lagrimeo y fotofobia. Los ataques graves a menudo van acompañados por malestar sistémico, debilidad, fatiga y, en ocasiones, dolor muscular tras períodos intensos de estornudos.

El *asma*, conocida también como una enfermedad reversible y obstructiva de las vías aéreas, se caracteriza por respuesta excesiva del árbol traqueobronquial a irritantes respiratorios y sustancias químicas broncoconstrictoras, lo que produce ataques de silbidos, disnea, opresión en el pecho y tos que son reversibles de manera espontánea o con tratamiento. Es una enfermedad crónica que compromete a todas las vías aéreas, pero que varía en gravedad de episodios transitorios leves y ocasionales a obstrucción bronquial crónica y grave de riesgo vital. El asma y la atopia pueden coexistir, pero sólo alrededor de la mitad de los asmáticos son también atópicos, y un porcentaje aun menor de pacientes atópicos tienen también asma. Sin embargo, la atopia y el asma no son del todo independientes, ya que el asma se presenta con mayor frecuencia en individuos atópicos que en no atópicos, en especial durante la niñez. Históricamente, el asma se ha dividido además en dos subgrupos, el de asma extrínseca y el de asma intrínseca.

El asma extrínseca, conocida también como asma alérgica, atópica o inmunológica, describe a pacientes que por lo general presentan asma en un período temprano de sus vidas, normalmente durante la niñez o la infancia. A menudo coexisten otras manifestaciones de atopia, como eczema o rinitis alérgica. Pueden producirse ataques de asma durante temporadas de polen, en presencia de animales o por exposición al polvo del hogar, almohadas de plumas u otros alergenos. Las pruebas dérmicas muestran reacciones positivas de reacción en llamarada con ronchas a los alergenos causantes. Un hecho interesante es que las concentraciones de IgE sérico son con frecuencia elevadas, pero en ocasiones son normales.

El asma intrínseca, conocida también como asma no alérgica o idiopática, aparece por lo general durante la vida adulta, tras una aparente infección respiratoria. Los síntomas incluyen obstrucción bronquial crónica o recurrente no relacionada con las temporadas de polen ni con la exposición a otros alergenos. Las pruebas dérmicas son negativas acerca de los alergenos atópicos habituales y la concentración de IgE sérico es normal. Otros síntomas incluyen sangre en el esputo y eosinofilia. Otros modelos para clasificar el asma en subgrupos, como de sensibilidad a la aspirina, de inducción por ejercicio, infecciosa y sicológica, solamente definen los factores desencadenantes que afectan a ciertos pacientes más que a otros.

Por último, es importante hacer notar que, si bien algunas clasificaciones han asociado históricamente el asma con la dependencia a IgE, existen en la actualidad datos estadísticamente significativos que muestran una correlación entre el IgE y el asma (tanto alérgica como no alérgica).

Capítulo 27, "The Atopic Diseases", A.I. Terr en Medical Immunology, 9a Ed., Simon and Schuster, Stites y col., Ed. (1997). Como resultado, el término "trastornos mediados por IgE", para fines de esta solicitud de patente, incluye el asma alérgica y la no alérgica.

Los indicios físicos de un ataque de asma incluyen taquipnea, silbidos audibles y uso de los músculos accesorios de la respiración. Generalmente también se observan pulso rápido y presión arterial elevada, como también niveles elevados de eosinofilos en la sangre periférica y secreciones nasales. Las funciones pulmonares muestran un descenso de los niveles de flujo y del volumen expiratorio forzado en 1 segundo (FEV_1). La capacidad pulmonar total y la capacidad residual funcional son por lo general normales o levemente mayores, pero pueden disminuir con broncoespasmo extremo.

La patología del asma puede distinguirse mediante reacciones de fase temprana y de fase tardía. La fase temprana se caracteriza por una contracción muscular suave, edema e hipersecreción, mientras que las reacciones de fase tardía se caracterizan por inflamación celular. El asma puede inducirse a través de diversos desencadenantes no específicos, como infecciones (*por ej.*, infecciones respiratorias virales), factores fisiológicos (*por ej.*, ejercicio, hiperventilación, respiración profunda, factores sicológicos), factores atmosféricos (*por ej.*, dióxido de azufre, amoníaco, aire frío, ozono, vapor de agua destilada), ingestantes (*por ej.*, propranolol, aspirina, fármacos antiinflamatorios no esteróideos), inhalantes experimentales (*por ej.*, soluciones hipertónicas, ácido cítrico, histamina, metacolina, prostaglandina $F_{2\alpha}$) e inhalantes ocupacionales (*por ej.*, isocianatos). Diversos otros alergenos ocupacionales o ambientales que producen asma alérgica pueden incluir productos animales, polvo de insectos, criaturas marinas, productos vegetales, frutas, semillas, hojas y polen, tinturas y tintas orgánicas, agentes microbianos, enzimas, agentes terapéuticos, agentes esterlizantes , además de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas.

La *dermatitis atópica*, conocida también como eczema, neurodermatitis, eczema o prúrigo de Besnier, es un trastorno crónico común específico de una subserie de pacientes con las características habituales e inmunológicas de la atopia. La característica esencial es una respuesta inflamatoria dérmica prurítica, que induce una erupción dérmica de distribución característicamente simétrica con predilección por ciertos puntos. Existe también con frecuencia una producción excesiva de IgE por parte de los linfocitos B. Si bien la dermatitis atópica se clasifica como una forma cutánea de atopia, ya que se asocia con rinitis alérgica y asma y niveles altos de IgE, la gravedad de la dermatitis, no obstante, no siempre guarda relación con la exposición a los alergenos en la prueba dérmica, y la desensibilización (a diferencia de otras enfermedades alérgicas) no es un tratamiento efectivo. Si bien el IgE sérico alto confirma un diagnóstico de asma alérgica, los niveles normales no lo descartan. La irrupción de la enfermedad puede producirse a cualquier edad, y las lesiones comienzan en forma aguda con pápulas edematosas eritematosas o placa con escamación. La picazón conduce a supuración y encostramiento, luego a liquenificación crónica. A nivel celular, la lesión aguda es esdemosa y la dermis se ve infiltrada con células mononucleares, linfocitos CD4. La presencia de neutrófilos, esosinófilos, células plasmáticas y basófilos es poco común, pero hay presentes células mastoides degranuladas. Las lesiones crónicas presentan hiperplasia epidérmica, hiperqueratosis y paraqueratosis, y la dermis se ve infiltrada por células mononucleares, células de Langerhan y células

mastoides. Puede haber también áreas focales de fibrosis, lo que incluye el compromiso del perineurio de los nervios pequeños.

La *gastroenteropatía alérgica*, conocida también como gastroenteropatía eosinofílica, es una manifestación atópica poco habitual en la que distintas sensibilidades a alimentos por IgE se asocian con una reacción local de la mucosa del tracto gastrointestinal. Es poco común en adultos, pero más común, aunque transitoria, en bebés. La afección surge cuando alergenos de alimentos ingeridos reaccionan con anticuerpos IgE en la mucosa yeyunal para liberar mediadores celulares, lo que produce síntomas gastrointestinales poco después de consumir los alimentos. La exposición continua produce inflamación crónica, que se traduce en pérdida de proteínas gastrointestinales y edema hipoproteico. La pérdida de sangre a través de la mucosa intestinal puede ser de un grado significativo suficiente para producir anemia por deficiencia de hierro. La reacción alérgica se produce localmente en la mucosa gastrointestinal superior tras exposición a alergenos, pero se resuelve al evitar los alergenos.

La *anafilaxis* y la *urticaria* son claramente mediadas por IgE, pero carecen de determinantes genéticos y no tienen predilección por individuos atópicos. La anafilaxis es una reacción alérgica aguda y generalizada con compromiso simultáneo de distintos sistemas de órganos, por lo general cardiovascular, respiratorio, cutáneo y gastrointestinal. La reacción es inmunológicamente mediada y se produce por exposición a un alergeno al que el sujeto ha sido previamente sensibilizado. Los términos urticaria y angioedema se refieren a la hinchazón física, el eritema y la picazón que resultan del receptor estimulado por histamina en vasos sanguíneos cutáneos superficiales, y es la característica cutánea típica de la anafilaxis sistémica. La anafilaxis sistémica es la ocurrencia de una reacción mediada por IgE simultáneamente en distintos órganos que resulta del veneno de un insecto o por el consumo de alimentos o fármacos. Es causada repentinamente por IgE cargado de células mastoides inducido por alergenos, lo que produce una alteración profunda y de riesgo vital en el funcionamiento de diversos órganos vitales. El colapso vascular, la obstrucción aguda de las vías aéreas, la vasodilatación cutánea y el edema, además de espasmos musculares gastrointestinales y genitourinarios ocurren casi en forma simultánea, aunque no siempre con el mismo grado.

La patología de la anafilaxis incluye angioedema y pulmones hiperinflados, con obstrucción de mucosa de las vías aéreas y atelectasia focal. A nivel celular, los pulmones tienen un aspecto similar que durante un ataque de asma agudo, con hipersecreción de las glándulas submucosas bronquiales, edema mucosal y submucosal, congestión vascular peribronquial y eosinofilia en las paredes bronquiales. Puede haber presente hemorragia y edema pulmonar. También puede ocurrir espasmo muscular bronquial, hiperinflación, e incluso ruptura de alvéolos. Importantes características de la anafilaxis humana incluyen edema, congestión vascular y eosinofilia en la lamina propria de la laringe, la tráquea, la epiglotis y la hipofaringe.

La exposición al alergeno puede ser a través de ingestión, inyección, inhalación o contacto con la piel o la membrana mucosa. La reacción comienza dentro de segundos o minutos tras la exposición al alergeno. Puede haber un miedo inicial o una sensación de muerte inminente, seguida rápidamente de síntomas en uno o más sistemas orgánicos diana: cardiovascular, respiratorio, cutáneo o gastrointestinal.

Los alergenos responsables de la anafilaxis difieren de aquéllos comúnmente asociados con la atopia. Las fuentes comunes son alimentos, fármacos, veneno de insectos o látex. Los alergenos de alimentos incluyen los presentes en crustáceos, moluscos (*por ej.*, langostas, camarones, jaibas), pescado, legumbres (*por ej.*, maní, arvejas, porotos, palo dulce), semillas (*por ej.*, sésamo, semilla de algodón, alcaravea, mostaza, semilla de linaza, maravilla), frutos secos, bayas, clara de huevo, alforfón y leche. Los alergenos de fármacos incluyen los presentes en polipéptidos y proteínas heterólogas, polisacáridos y fármacos hapténicos. Los alergenos de insectos incluyen insectos de la orden Hymenoptera, como la abeja melífera, la avispa chaqueta amarilla, avispón, avispa común y hormiga colorada.

Si bien la epinefrina es el tratamiento típico para la anafilaxis, generalmente se prescribe antihistamina u otros bloqueadores de histamina para reacción angioedémica o urticaria menos grave.

E. Terapias combinadas

El método de la invención puede combinarse con métodos conocidos de tratamiento para trastorno mediado por IgE, ya sea como pasos de tratamiento combinados o adicionales o como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

Por ejemplo, las antihistaminas, en especial las antihistaminas no sedantes, pueden administrarse antes o de acuerdo con los anticuerpos anti IgE de la invención. Las antihistaminas adecuadas incluyen las de los grupos de la alquilamina (*por ej.*, clorfeniramina), etanolamina (*por ej.*, difenhidramina) y fenotiazina (*por ej.*, prometazina). Si bien muchas antihistaminas antagonizan los efectos farmacológicos de la histamina al bloquear sus puntos receptores en las células efectoras, otros fármacos antihistamínicos comunes funcionan bloqueando la liberación de la histamina de células mastoides que han sido sensibilizadas y armadas con IgE específico de alergeno (por ej., sodio de cromolina). Ejemplos de antihistaminas incluyen astemizol, maleato de azatadina, maleato de brofeniramina, maleato de carbinoxamina, hidrocloruro de cetirizina, fumarato de clemastina, hidrocloruro de ciproheptadina, maleato de dexbromfeniramina, maleato de dexclorfeniramina, dimenhidrinato, hidrocloruro de difenhidramina, succinato de doxilamina, hidrocloruro de fexofendadina, hidrocloruro de terfenadina, hidrocloruro de hidroxizina, loratidina, hidrocloruro de meclizina, citrato de tripelanamina, hidrocloruro de tripelenamina, hidrocloruro de triprolidina.

Los síntomas particulares de trastornos mediados por IgE (*por ej.*, reaciones de fase temprana) pueden aliviarse con simpatomiméticos o fármacos con efecto broncodilatador. La epinefrina es un adrenérgico alfa y beta de amplia acción que se administra a menudo en forma subcutánea en una dosis de 0,2 - 0,5 ml de solución acuosa 1:100. Se usa también una forma de acción más prolongada de la epinefrina (*es decir*, la terbutalina) en suspensión de 1:200 cuando se desea un efecto más prolongado. Otros adrenérgicos beta adecuados incluyen albuterol, pirbuterol, metaproterenol, salmeterol, isoetarina y formeterol para administración nasal (*por ej.*, nebulizador manual, dispositivo de respiración de presión positiva intermitente, o inhaladores presurizados con dosis medida) u oral.

La broncodilatación puede lograrse a través de la administración de xantinas, en especial cuando se administran en combinación con los fármacos simpatomiméticos anteriores. Ejemplos de

xantinas incluyen la aminofilina (iv. 250-500 mg) y la teofilina (oral, concentración sérica 10-20 μg/ml).

Otros síntomas de diversos trastornos mediados por IgE (*por ej.*, reacciones de fase tardía) pueden verse atenuados mediante el tratamiento con glucocorticoides u otros fármacos que tengan efectos antiinflamatorios. La prednisona (30-60 mg diarios) se administra sistémicamente para ataques graves, mientras que el dipropionato de beclometasona, el flunisólido y el acetónido de triamcinolona se administran en forma de aerosol como terapia de mantenimiento de largo plazo. Otros corticosteroides que tienen efecto antiinflamatorio incluyen: betametasona, budesónido, dexametasona, acetato de fludrocortisona, flunisólido, propionato de fluticasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona.

Los fármacos antiinflamatorios no esteróideos que pueden también usarse en combinación con los métodos terapéuticos de la invención incluyen acetaminofeno, aspirina, sodio de bromfenac, sodio de diclofenac, diflunisal, etodolac, calcio de fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, sodio de meclofenamato, ácido mefenámico, nabumetono, naproxeno, sodio de naproxeno, oxifenbutazono, fenilbutazono, piroxicam, sulindac, sodio de tolmetina.

Además, puede alcanzarse también el máximo beneficio terapéutido con la administración de descongestionantes (*por ej.*, fenilefrina, fenilpropanolamina, seudoefadrina), antitusivos (*por ej.*, dextrometorfano, codeína, o hidrocodono) o analgésico (*por ej.*, acetaminofeno, aspirina).

La desensibilización a alergenos es una forma de tratamiento en la que se inyectan alergenos al paciente con el fin de reducir o eliminar la respuesta alérgica. Se conoce también como inmunoterapia de alergenos, hiposensibilización o terapia de inyección de alergenos. Se usa a menudo en combinación con otros tratamientos contra las alergias, pero no comúnmente como tratamiento principal. Se ha empleado exitosamente cuando es imposible evitar los alergenos. Un tratamiento típico de desensibilización a alergenos incorpora una inyección subcutánea de alergenos estériles en dosis en aumento una o dos veces por semana hasta que se logra una dosis que produce un área local pequeña y transitoria de inflamación en el punto de la inyección. La dosis se administra entonces según un programa de mantenimiento una vez cada 2-4 semanas. La desensibilización a alergenos se usa con mayor frecuencia en el tratamiento de asma alérgica y rinitis alérgica, aunque ha tenido éxito en el tratamiento de la anafilaxis. La desensibilización también se ha usado efectivamente a través de adyuvantes, como el adyuvante incompleto de Freund, que es una emulsión de antígeno acuosa en aceite mineral. El efecto fisiológico crea un depósito líquido insoluble desde el cual van liberándose gradualmente gotas de alergeno. Otra forma de desensibilización a alergenos es polimerizar alergenos monoméricos con glutaraldehído para crear una molécula con alergenicidad relativamente baja (es decir, causa una respuesta alérgica), mientras retiene un grado efectivo de inmunogenicidad.

F. Dosis farmacéuticas:

Las dosis y las concentraciones farmacológicas deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar, dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiadas es parte de la experiencia de técnico común. Los

experimentos en animales son una guía confiable para la determinación de las dosis eficaces para el tratamiento en humanos. El ajuste de las dosis eficaces para los organismos interespecíficos puede realizarse siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development,* Yacobi y col., Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-46.

Cuando se utiliza la administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos aquí descritos, las dosis normales pueden variar entre 10 ng/kg y 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente entre 1 mg/kg/día y 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. La documentación sobre la materia ofrece diversas guías sobre las dosis particulares y los métodos de administración. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.657.760; 5.206.344; ó 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos y que puede ser necesario realizar la administración dirigida a un órgano o tejido específico de manera distinta a la realizada para otro órgano o tejido. Además, las dosis pueden aplicarse mediante una o más a administraciones separadas, o mediante infusión continua. En el caso de administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que ocurra una supresión deseada de los síntomas de la misma. No obstante, otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y pruebas convencionales.

G. Administración de la formulación

Las formulaciones de la presente invención, que incluyen, entre otras, las formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero que necesita tratamiento con la proteína, de preferencia un humano, de acuerdo con métodos conocidos, como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un período, mediante ruta intamuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación.

En realizaciones preferidas, las formulaciones se administran al mamífero por vía subcutánea (*es decir*, por debajo de la piel). Para tales fines, la formulación puede inyectarse usando una jeringa. Sin embargo, se dispone de otros dispositivos de administración de la formulación, como dispositivos de inyección (*por ej.,* los dispositivos INJECT-EASE™ y GENJECT™); lápices inyectores (como el GENPEN™); dispositivos de autoinyección, dispositivos sin agujas (*por ej.,* MEDIJECTOR™ y BIOJECTOR™); y sistemas subcutáneos de suministro con parche.

En una realización específica, la presente invención se orienta a equipos para una unidad de administración de una sola dosis. Dichos equipos constan de un recipiente de una formulación acuosa de anticuerpo o proteína terapéutica, que incluye jeringas prellenadas de una o varias cámaras. Ejemplos de jeringas prellenadas están disponibles a través de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosis adecuada ("cantidad terapéuticamente efectiva") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección a tratar, de la gravedad y de la evolución de la afección, de si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, de terapias anteriores, del historial clínico del paciente y de su respuesta a la proteína, del tipo de proteína que se use, y del criterio del médico tratante. La proteína se administra debidamente al paciente en una ocasión o en una serie de

tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento a partir del diagnóstico. La proteína puede administrarse como tratamiento único o en conjunto con otros fármacos o terapias útiles para tratar la afección en cuestión.

En caso de que la proteína elegida sea un anticuerpo, la dosis inicial puede ser de alrededor de 0,1-20 mg/kg para administración al paciente con, por ejemplo, una o más administraciones separadas. No obstante, otros regímenes de dosificación también pueden ser útiles. El progreso de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas convencionales.

Los usos para una formulación anti-IgE (*por ej.*, rhuMAbE-25, rhMAbE-26, Hu-901) incluyen el tratamiento de profilaxis o enfermedades alérgicas mediadas con IgE, infecciones parasíticas, cistitis interesticial y asma, por ejemplo. Según la enfermedad o el trastorno que se trate, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva (*por ej.*, de alrededor de 1-15 mg/kg) del anticuerpo anti-IgE.

H. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación consta de un recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (*por ej.*, viales de cámara doble), jeringas (como jeringas de cámara simple o doble) y tubos de pruebas. Los recipientes pueden estar fabricados a partir de diversos materiales, como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación. La etiqueta, que va puesta en el recipiente o adjunta a éste puede contener instrucciones para reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar también que la formulación es útil o que está destinada para administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, que permite administraciones repetidas (*por ej.*, de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede constar también de un segundo recipiente que consta de un diluyente adecuado (*por ej.*, BWFI). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir también otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidas otras soluciones tamponadas, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.

La invención se entenderá a mayor cabalidad mediante referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, éstos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Mediante la presente, todas las citas de la divulgación se incorporan expresamente a manera de referencia.

En otra realización, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende las formulaciones aquí descritas para administración en un dispositivo de autoinyección. Un dispositivo de autoinyección puede describirse como un dispositivo de inyección que, al activarlo, suministra el contenido sin que sea necesaria otra acción por parte del paciente o administrador. Son particularmente adecuados para la automedicación de formulaciones terapéuticas cuando el nivel de suministro debe ser constante y el tiempo de suministro es mayor que unos momentos.

EJEMPLO 1

Aislamiento de IgE de primate

El IgE humano fue clonado de la línea celular de mieloma de IgE humano U266 (ATCC, Manassas, VA, TIB #196). Las secuencias IgE de rhesus y mono cynomolgus se determinaron clonando y secuenciando el IgE del ADNc derivado de células mononucleares de sangre periférica de rhesus y mono cynomolgus que habían sido estimuladas para generar células modificadas por IgE (PBMC). Se diseñaron cebadores sentido y antisentido (se muestran a continuación) a partir de las secuencias de IgE humanas. Se diseñó un cebador sentido justo hacia la izquierda del 5' del dominio CH2. El cebador antisentido se diseñó al final del dominio transmembránico. Se obtuvieron PBMC de rhesus y de mono cynomolgus del Centro Nacional de Investigación de Primates de California (Davis, CA). 5 x 10^6 PBMC fueron cultivadas con IL-4 (100 ng/ml) y CD40L (3 µg/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN, #204-IL y #617-CL respectivamente) durante 4 días. Luego se cosecharon las células, se preparó el ARN (RNeasy Mini Kit, #74106, Qiagen, Valencia, CA), y se hizo el ADNc usando equipo de cebado BD Sprint Powerscript oligo dT (BD Biosciences, San José, CA, #639558). Se realizó entonces una RT-PCR [94°C 2 minutos; 94°C 15 segundos; 60°C 30 segundos; 68°C 2 minutos; 30 ciclos; 68°C 10 minutos]. Se agregó polimerasa Taq (10 minutos 72oC) después de los ciclos indicados para agregar sobresalientes de A para clonación de TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, #45-0641). Se clonaron productos de PCR mediante clonación de TOPO-TA y luego los clones se verificaron por secuencia (Genentech, Inc.). Se alinearon las secuencias humanas, de rhesus y mono cynomolgus usando programas de análisis internos (Genentech, Inc.). Las siguientes homologías son para secuencias entre los dominios CH2 y transmembránico. Entre rhesus (432 aminoácidos) y mono cynomolgus (431 aminoácidos) hubo 6 diferencias, que equivale aproximadamente a una homología de 98,6%. Entre humanos y rhesus hubo 53 diferencias, que equivalen a una homología de 87,7%. Entre humanos y mono cynomolgus hubo 56 diferencias, que equivalen a una homología de 87% (ver figura 1).

Cebadores utilizados para la clonación:

Cebadores sentido hacia la izquierda del 5' de la secuencia CH2:

5'-ccgcccaccgtgaagatcttacagtc (N° identificador de secuencia: 63)

Cebador antisentido al final del dominio transmembránico:

5'-cggctcgagactaggcgtggggctggaggacgttg (N° identificador de secuencia: 64)

EJEMPLO 2

Aislamiento de anticuerpos anti-IgE/M1'

Generación de la proteína de fusión CH3-CH4-M1'/Fc

La proteína de fusión CH3-CH4-M1'/Fc de IgE humano fue generada mediante amplificación con PCR de los dominios CH3-CH4-M1' de IgE humano, más 15 aminoácidos adicionales inmediatamente hacia la derecha del 3' respecto del dominio M1' de cDNA preparados con células

U266 (ATTC Manassas, VA, TIB#196). Se preparó el ARN a partir de células U266 (RNeasy Mini Kit, #74106, Qiagen, Valencia, CA), y se hizo el ADNc usando equipo de cebado BD Sprint Powerscript oligo dT (BD Biosciences, San José, CA, #639558). Se realizó una RT-PCR, y el producto de la PCR fue clonado mediante clonación TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, #45-0641). Se agregó una secuencia de señal de N-terminal mediante mutagénesis de PCR para expresión en células mamíferas y se clonó la secuencia de señal +CH3+CH4+M1'+15 aminoácidos fue clonada en un vector de expresión (pRK huIgG1 Fc; Genentech) para generar una fusión de terminal C con la región IgG1 Fc humana. La secuencia de la proteína final, incluida la secuencia de señales y el IgG1 Fc humano es la siguiente:

MGWSCIILFLVATATGVHSTKKCADSNPRGVSAYLSRPSPFDLFIRKSPTITCLVVDLAPSKGT
VNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALM
RSTTKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPDARHST
TQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAEWEQKDEFICRAVHEAASPSQTVQRAVSVNPGLAGGSAQS
QRAPDRVLCHSGQQQGLPRAAGGSVPHPRCHCGAGRADWPGPPELDVCVEEAEGEAPWRA
QVTDKAAHYTLCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:65)

La proteína fue producida mediante transfección transitoria de células CHO (Genentech), y la proteína fue purificada de supernatante de cultivo celular usando técnicas convencionales de cromatografía en columnas de sefarosa de proteína A.

Inmunización y creación de hibridomas

Usando la proteína CH3-CH4-M1'/Fc, se generó un panel de anticuerpos panespecíficos que se unieron selectivamente al segmento M1' de IgE-M1' humano. Se le inyectó a las dos patas traseras de un ratón BALB/c 1 µg CH3-CH4-M1'/Fc resuspendido en monofosforil-lípido A y adyuvante de dicorinomicolato de trehalosa (MPL™ + TDM) (Corixa, Hamilton, MT) con intervalos de 3 a 4 días. Se extrajo suero tras 8 refuerzos y se tituló mediante ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) y separación de células activada por fluorescencia y citometría de flujo (prueba FACS, ver sección siguiente) para garantizar que el ratón había tenido una buena respuesta inmunológica a CH3-CH4-M1'/Fc. Tres días después del refuerzo final, se fusionaron los nódulos popliteales con la línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag.U.1 (ver, por ejemplo, Chuntharapai y col., 1997, *Methods Enzymol.* 288:15-27). Las células de hibridoma fusionadas fueron seleccionadas de células de mieloma o de nódulo popliteal no fusionadas usando selección de hipxantina-aminopterina-timidina (HAT) en Medium D del equipo de selección de hibridoma de ClonaCell® (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC, Canada), que produjo la generación de 4224 clones.

Cribado de anticuerpos M1' antihumanos panespecíficos

Los clones de hibridoma generados como se describiera anteriormente fueron cribados para producción de anticuerpos monoclonales que se unen con la región M1' de la proteína

CH3-CH4-M1'/Fc, la región M1' del IgE-M1' humano expresada establemente en la superficie de la línea celular de linfoma de células B de ratón A20 (IgE-M1'/A20), y la región M1' del IgE-M1' humano expresada establemente en la superficie de la línea celular de linfoma células B de humano BJAB (IgE-M1'/BJAB). Los controles negativos incluyeron CD-4/Fc humano, IgE humano expresado establemente en la superficie de la línea celular de linfoma de células B de ratón A20 (IgE/A20), línea celular de linfoma de células B de ratón A20 (A20), IgE humano expresado establemente en la superficie de la línea celular de linfoma de células B humano BJAB (IgE/BJAB), y en la línea celular de linfoma de células B humano BJAB (BJAB).

Prueba ELISA

Para cribar los 4224 clones, se realizó el ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), generalmente descrito en Baker y col., 2002, *Trends Biotechnol.*, 20:149-156. Se realizaron ensayos en placas de 384 y de 96 pocillos. En resumen, se revistió una placa de 384 (or de 96) pocillos con 50 µl de IgG Fc antihumano de cabra (MP Biomedicals, Irvine, CA) con una concentración de 2 µg/ml en tampón de recubrimiento (tampón de carbonato 0,05 M, pH 9,6), se selló y se almacenó una noche a 4°C. Tras eliminar la solución de revestimiento, se agregó a cada pocillo 80 µl (ó 200 µl para una placa de 96 pocillos) de solución de ensayo/bloqueo que contenía albúmina de bovino 0,5% y 0,05% Tween®-20 en PBS (pH 7,4) (diluyente ELISA), y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Los pocillos se lavaron entonces tres veces con 100 µl (ó 300 µl para una placa de 96 pocillos) 0,05% Tween ®-20 en PBS (tampón de lavado).

Después del paso de lavado, se agregaron a cada pocillo 50µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de solución de antígeno con 0,4 µg/ml de CH3-CH4-M1'/Fc o CD-4/Fc humano en diluyente ELISA, y las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora con agitación. Los pocillos fueron lavados tres veces con tampón de lavado como la vez anterior. Se agregó supernatante de clones de hibridoma individuales, de modo que los dos pocillos, uno con CH3-CH4-M1'/Fc y otro pocillo con CD-4/Fc humano, recibieron 50 µl (o 100 µl para un aplaca de 96 pocillos) de supernatante de un solo clon de hibridoma. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora con agitación, y los pocillos fueron lavados tres veces con tampón de lavado como la vez anterior.

Tras el lavado, en cada pocillo se agregaron 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de una dilución de 1:1000 de IgG antirratón de oveja combinado con peroxidasa de rábano (sin reactividad cruzada a IgG humano (MP Biomedicals)) en diluyente ELISA. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante una hora con agitación, fueron lavadas tres veces con tampón de lavado como la vez anterior, y se las secó dando leves palmadas con un paño. Se revelaron los pocillos agregando 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de sustrato de peroxidasa de micropocillos de tetrametilbenzidina (TMB) (BioFX Laboratories, Owing Mills, MD, catalog #TMBW-0100-01) a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante 5-10 minutos hasta que se observó un buen cambio de color. Se detuvo el revelado agregando 50 µl (o 100 µl para una placa de 96 pocillos) de TMB Stop Solution (BioFX Laboratories catalog #BSTP-0100-01) a cada

pocillo. Se analizaron las placas con un lector de placas Sunrise (Tecan US, Inc., Research Triangle Park, NC) a 650 nm.

Como controles se usaron suero preinmune y polisueros. Las muestras de suero preinmune contenían sueros de ratón anteriores a la inmunización, y las muestras de polisueros contenían antisueros de ratón obtenidos tras 10 inmunizaciones.

Prueba FACS

Para cribar 3221 generados en el ejemplo 1, se realizó la separación de células activada por fluorescencia (FACS) usando líneas celulares IgE-M1'/A20 e IgE-M1'/BJAB. Como controles negativos se usaron las líneas celulares IgE/A20, IgE/BJAB, A20 y BJAB. Las células fueron resuspendidas y centrifugadas a 500g durante 5 minutos a 4°C. Los medios se aspiraron y las células fueron resuspendidas en tampón de 4°C FACSFlow (BD Biosciences, San José, CA) con suero de bovino fetal al 1% (tampón de tinción de células). Las células fueron centrifugadas como las veces anteriores, se aspiraron los medios y las células fueron resuspendidas a $2x10^6$ células/ml de tampón de tinción de células a 4°C. Se agregaron las células a 96 placas de fondo redondo a 50 µl/pocillo ($1x10^5$ células/pocillo), y se agregaron 100 µl de supernatante de clones de hibridoma individuales a cada pocillo, de modo que cada supernatante de hibridoma fue incubado con un pocillo que contenía cada línea celular. La placa fue incubada en hielo durante 30 minutos. La placa fue centrifugada a 500g durante 5 minutos a 4°C y los supernatantes fueron aspirados. Cada pocillo fue resuspendido en tampón de tinción de células de 200 µl a 4°C, y las placas fueron centrifugadas como la vez anterior. Se aspiró el tampón de tinción de células.

Tras el paso de lavado, las células de cada pocillo fueron resuspendidas en 100 µl de una dilución 1:1000 de IgG Fc antirratón de cabra combinada con R-ficoeritrina (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) en un tampón de tinción de células a 4°C, y las placas fueron incubadas a oscuras en hielo durante 30 minutos. La placa fue centrifugada a 500g durante 5 minutos a 4°C y los supernatantes fueron aspirados. Cada pocillo fue resuspendido en tampón de tinción de células de 200 µl a 4°C, y las placas fueron centrifugadas como la vez anterior. Se aspiró el tampón de tinción de células. Las células de cada pocillo fueron resuspendidas en 200 µl de tampón de tinción de células a 4°C y se transfirieron a microtubos de titulación de 1,2ml (Quality Scientific Plastics, Petaluma, CA). La FACS se realizó en un FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences).

Secuenciado de terminal N/Aislamiento de ARN/secuenciado y clonación

Los anticuerpos fueron purificados del supernatante de hibridomas anti-IgE/M1', y se analizaron para realizar la secuencia de terminal N para determinar la clonalidad en salina tamponada de fosfato. Cada anticuerpo fue separado en un gel SDS-PAGE de Tris HCl Precast 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA) bajo condición reductora. La cadena pesada (HC) y cadena ligera (LC) resueltas fueron sujetas a secuenciado de terminal N usando una secuenciadora de terminal N Procise 494 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el ciclo de 20 minutos descrito en Henzel *y col. Analytical Biochemistry* 267, 148-160 (1999). Los primeros 25 residuos fueron secuenciados para establecer la monoclonalidad. Cuando la cadena HC o LC del anticuerpo fue bloqueada con un grupo

piroglutamilo que hacía el aminoácido del terminal N inaccesible para el secuenciado Edman, se realizó una eliminación del bloqueo antes del secuenciado. El grupo piroglutamilo fue eliminado con la enzima aminopeptisada de piroglutamato (PGAP, Sigma, St Louis, MO) usando el protocolo descrito por Pham *y col. Electrophoresis* 2005, 26 4243-4251.

Se determinó que la secuencia de anticuerpos de la cadena pesada (HC) y de la cadena ligera (LC) M1' 7A6, 1C11, 47H4, 26A11, 45C1 y 28E9 eran las siguientes:

7A6

HC	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS	(N° identificador de secuencia: 66)
LC	DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTLSCKS	(N° identificador de secuencia: 67)

1C11

HC	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS	(N° identificador de secuencia: 68)
LC	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKS	(N° identificador de secuencia: 69)

47H4

HC	EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS	(N° identificador de secuencia: 70)
LC	DVVLTQTPLSLPVSLGDQASI	(N° identificador de secuencia: 71)

26A11

HC	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS	(N° identificador de secuencia: 72)
LC	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRS	(N° identificador de secuencia: 73)

45C1

HC	QIQLVQSGPELKKPGETVK	(N° identificador de secuencia: 74)
LC	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCK	(N° identificador de secuencia: 75)

28E9

HC	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATS	(N° identificador de secuencia: 76)
LC	DIQMTQSPASLSVSVGETVTFTCR	(N° identificador de secuencia: 77)

A fin de determinar las secuencias de extensión completa, se diseñaron cebadores degenerados de 5' a partir de las secuencias de aminoácidos de terminal N y segmentos de genes Ig conocidos, y se realizó la PCR con secuencias conservadas de cadenas pesada y ligera degeneradas a la derecha de 3'.

Cebadores sentido

7A6

HC	FOR.BsiWI	5'-tcgacgtacgctcaggttcagctgcagcaatctggggctgagctgg (N° identificador de secuencia: 78)
LC	FOR.EcoRV	5'-gatcgatatcgtgatgtcccagtctccctcctccctaac

(N° identificador de secuencia: 79)

1C11

HC	FOR.BsiWI	5'-tcgacgtacgctcaggttcaattgcagcagtctggggctgagctgg
		(N° identificador de secuencia: 80)
LC	FOR.EcoRV	5'-gatcgatatcgtaatgtctcagtctccttcctccctagc
		(N° identificador de secuencia: 81)

47H4

HC	9.1HCF.BsiWI	5'-tcgacgtacgctgaggtgaagttggtggagtctgggggaggcttag
		(N° identificador de secuencia: 82)
LC	47H4LCF.EcoRV	5'-gatcgatatcgtgctgactcagactccactctccctgcc
		(N° identificador de secuencia: 83)

26A11

HC	C7F7HCF.BsiWI	5'-tcgacgtacgctgaggtccagctccagcagtctggacctgagc
		(N° identificador de secuencia: 84)
LC	2B4LCF.EcoRV	5'-gatcgatatccagatgacccaaactacatcctccctg
		(N° identificador de secuencia: 85)

45C1

HC	2G6HCF.BsiWI	5'-tcgacgtacgctcagatccagttggtgcagtctggacctgagctg
		(N° identificador de secuencia: 86)
LC	9C10LCF.EcoRV	5'-gatcgatatcgtgatgacgcagactccactcactttgtcgg
		(N° identificador de secuencia: 87)

28E9

HC	9.1HCFBsiWI	5'-tcgacgtacgctgaggtgaagctggtggagtctgaaggaggcttgg
		(N° identificador de secuencia: 88)
LC	5E10.LCF.EcoRV	5'- gatcgatatccagatgacccagtctccagcctccctatc
		(N° identificador de secuencia: 89)

Cebadores antisentido

Cebador de cadena pesada (HCR)	5'-ctggacagggatccagagttccaggtcactgtcactggctcaggg
	(N° identificador de secuencia: 90)
Cebador de cadena ligera (LCR)	5'-ctgtaggtgctgtctttgctgtcctgatcagtccaactg
	(N° identificador de secuencia: 91)

Se cosechó el ARN de hibridomas anti-IgE/M1' (RNeasy Mini Kit, #74106, Qiagen, Valencia, CA), y se preparó el ADNc usando equipo de cebado BD Sprint Powerscript oligo dT (BD Biosciences, San José, CA, #639558). Se realizó la PCR usando los cebadores anteriores y los productos de la PCR fueron clonados usando el equipo TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA, #45-0641). Se hizo la PCR usando polimerasa de alta fidelidad Platinum Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, # 11708-039) con condiciones de PCR [94°C 2 minutos; 94°C 15 segundos; 60°C 30 segundos; 68°C 2 minutos; 30 ciclos; 68oC 10 minutos]. Se cribaron los clones para detectar insertos y se

secuenciaron múltiples clones (Genentech, Inc.) para verificar la secuencia de genes de la cadena pesada y la cadena ligera anti-IgE/M1' original.

Los dominios variables de anticuerpos anti-M1' fueron subclonados en vectores de expresión con diferentes regiones Fc para generar anticuerpos quiméricos con diferentes especies y/o Fc de isotipos. Se diseñaron cebadores para clonar el dominio variable (CDR + estructura) en regiones FC IgG2a de ratón, IgG2a-DANA de ratón e IgG1 de humano.

Se diseñaron cebadores para incorporar sitios de restricción con secuencia de cadena pesada y ligera. Se clonaron cadenas pesadas usando BsiWI y ApaI. Se clonaron cadenas ligeras usando EcoRV y KpnI. A continuación se digirieron nuevos productos de PCR y se ligaron a mIgG2a (LPG10), mIgG2a-DANA (pErk-E27DANA), o huIgG1 para cadena pesada, or vectores de expresión de mKappa (LPG2) o huKappa (Genentech, Inc.). Los clones finales fueron verificados por secuencia (Genentech, Inc.).

Las siguientes son las combinaciones de cebadores de 3' y de cebadores sentido y antisentido para la clonación de secuencias variables de CDR:

Cebadores antisentido

7A6

HC	REV.ApaI	5'-accgatgggcccttggtggaggctgaagagactgtgag	(N° identificador de secuencia: 92)
LC	REV.KpnI	5'-ccttggtacccccctccgaacgtgtacggatagctataatattg	(N° identificador de secuencia: 93)

1C11

HC	REV.ApaI	5'-gaccgatgggcccttggtggaggctgaggagactgtg	(N° identificador de secuencia: 94)
LC	REV.KpnI	5'-ccttggtacccccctccgaacgtgtacggatagctataa	(N° identificador de secuencia: 95)

47H4

HC	47H4HCR.ApaI	5'-tgggcccttggtggaggctgaggagacggtgactgag	(N° identificador de secuencia: 96)
LC	47H4LCR.KpnI	5'-ttccaacttggtacctccacc	(N° identificador de secuencia: 97)

26A11

HC	7G8HCR.ApaI	5'- gaccgatgggcccttggtggargctgcagagacagtgaccagag	(N° identificador de secuencia :98)
LC	47H4LCR.KpnI	5'-ttccaacttggtacctccacc	(N° identificador de secuencia: 99)

45C1

HC	45C1HCR.ApaI	5'-cgatgggcccttggtggargckgaggagacggtgagaatg	(N° identificador de secuencia: 100)
LC	5C2LCR.KpnI	5'-agcttggtacccccctccg	(N° identificador de secuencia: 101)

28E9

HC	28E9.HC.REV.ApaI	5'-cgatgggcccttggtggaggctgaggagacggcgactgag	(N° identificador de secuencia: 102)
LC	1D5.2LCR,KpnI	5'- ttccaacttggtacccgagccg	(N° identificador de secuencia: 103)

Combinaciones de cebadores:

		Sentido:		Antisentido:
7A6:	HC	7A6.FOR.BsiWI	---	7A6.REV.ApaI
	LC	7A6.FOR.EcoRV	---	7A6.REV.KpnI
1C11:	HC	1C11.FOR.BsiWI	---	1C11.REV.ApaI
	LC	1C11.FOR.EcoRV	---	1C11.REV.KpnI
47H4:	HC	9.1.HCF.BsiWI	---	7H4HCR.ApaI
	LC*	47H4.LCF.EcoRV	---	47H4.LCR.KpnI
26A11	HC	C7F7.HCF.BsiWI	---	7G8.HCR.ApaI
	LC	2B4.LCF.EcoRV	---	47H4.LCR.KpnI
45C1	HC	2G6.HCF.BsiWI	---	45C1.HCR.ApaI
	LC	9C10.LCF.EcoRV	---	5C2.LCR.KpnI
28E9	HC	9.1.HCF.BsiWI	---	28E9.HCR.ApaI
	LC	5E10.LCF.EcoRV	--	1D52.LCR.KpnI

La cadena ligera 47H4 tenía un sitio interno KpnI que impedía la clonación directa a los vectores de expresión mKappa y huKappa. El sitio interno KpnI se mutó usando el equipo Quick Change XL Site Directed Mutagenesis (Stratagene, Cedar Creek, Texas, #200517-5) [95°C 1minuto; 95°C 50 segundos; 60°C 50 segundos; 68°C 4,5 minutos; 68°C 7minutos]. Los cebadores fueron diseñados de acuerdo con los requisitos del equipo para mutar un solo nucleótido dentro del sitio KpnI que no cambió la secuencia de aminoácidos. TAC se mutó a TAT, lo que mantuvo la tirosina (Y) en esa posición. Los clones finales fueron verificados por secuencia (Genentech, Inc.).

Los cebadores utilizados para mutagénesis fueron:

FOR	5'-cc tat tta cat tgg tat ctg cag aag cca ggc c	(N° identificador de secuencia: 104)
REV	5'-ggc ctg gct tct gca gat acc aat gta aat agg	(N° identificador de secuencia: 105)

EJEMPLO 2A

Humanización de anticuerpos anti-IgE/M1'

En este ejemplo se describe la humanización de los anticuerpos anti-IgE/M1' de murino 26A11, 7A6 y 47H4.

Materiales y métodos

El dominio M1' de membrana asociado con el IgE humano fue expresado como fusión de Fc en células CHO y purificado con métodos convencionales. Los hibridomas que expresan los anticuerpos 26A11, 7A6 y 47H4 se obtuvieron inmunizando ratones con la proteína de fusión recombinante M1'-Fc y se identificaron mediante ELISA usando placas recubiertas de M1'-Fc. Se identificaron los anticuerpos funcionales de acuerdo con su capacidad de unirse a células de expresión M1' y de promover la apoptosis.

Clonación de dominios variables de murino 26A11, 7A6 y 47H4 – Usando métodos convencionales, se extrajo el ARN total a partir de células de hibridoma que producían 26A11, 7A6 ó 47H4. El dominio variable ligero (VL) y el dominio variable pesado (VH) se amplificaron usando RT-PCR con los cebadores degenerados de las cadenas ligera y pesada. Los cebadores anversos eran especí-ficos para la secuencia de aminoácidos N-terminal de las regiones VL y VH. Los cebadores reversos de las cadenas ligera y pesada, respectivamente, se diseñaron para hibridar en una región del dominio constante ligero (CL) y del dominio constante pesado 1(CH1), y que se conservan en gran medida entre las especies. La secuencia de polinucleótidos en las inserciones se determino mediante métodos de secuenciación habituales. Las secuencias de aminoácidos 26A11, 7A6 y 47H4 VL y VH aparecen en las **Figuras 6A y 6D, 6B y 6E, y 6C y 6F,** respectivamente.

Injertos de regiones hipervariables en la estructura de consenso humana del aceptor – El fagémido utilizado para este trabajo es un vector de presentación de Fab-g3 monovalente y consiste en 2 marcos de lectura bajo control de un solo promotor de phoA. La primera estructura de lectura abierta consiste en una secuencia de señal stII fusionada con los dominios VL y CH1 de la cadena ligera del aceptor y la segunda consiste en la secuencia de señal stII fusionada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada del aceptor seguida por la proteína de la cápside del fago menor P3.

Los dominios VL y VH de anticuerpos de murino 26A11, 7A6 ó 47H4 (mu26A11, mu7A6 o mu47H4) se alinearon con las secuencias de consenso de los subgrupos VH III humano (huIII) y kappa I VL humano (huKI). Para hacer los injertos CDR, se injertaron regiones hipervariables de mu26A11, mu7A6 o mu47H4 en las estructuras del aceptor de consenso huKI y huIII para generar el injerto CDR directo (26A11.v1, 7A6.v1 ó 47H4.v1) (**Figuras 6A-6F**). En el dominio VL, las siguientes regiones se injertaron al aceptor de consenso humano: las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3). En el dominio VH, se injertaron las posiciones 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 94-102 (H3). MacCallum *y col.* [MacCallum *y col. J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))] han analizado estructuras de cristal complejas de anticuerpos y antígenos y determinaron que las posiciones 49 y 94

de la cadena pesada eran parte de la región de contacto, por lo que parece razonable incluir estas posiciones en la definición de CDR-H2 y CDR-H3 al humanizar anticuerpos.

Los anticuerpos anti-IgE/M1' 26A11.v1, 7A6.v1 y 47H4.v1 fueron generados como anticuerpos IgG mediante mutagénesis Kunkel de vectores de expresión LC y HC usando oligonucleótidos separados para cada región hipervariable. Los cambios a los aminoácidos para aumentar la estabilidad también se hicieron usando mutagénesis Kunkel. Kunkel *y col., J. Biol. Chem.* 263(29): 14784-14789 (1988). Los clones correctos se identificaron mediante la secuenciación del ADN.

Producción de IgG - Para fines de cribado, las variantes de IgG se produjeron incialmente en células 293. Los vectores que codificaban VL y VH (25 µg) fueron transferidos a células 293 usando el sistema FuGene. Se mezclaron 500 µl de FuGene con 4,5 ml de medios DMEM sin contenido de FBS y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Cada una de las cadenas (25 µg) se agregaron a esta mezcla y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min y luego se transfirieron a cinco frascos T-150 para transfección durante una noche a 37 °C en CO_2 al 5%. Al día siguiente, se removieron los medios que contenían la mezcla de transfección y se reemplazaron por 23 ml de medios PS04 con 0,1 ml/L de elementos de rastro (A0934) y 10 mg/L de insulina (A0940). Se incubaron las células durante otros 5 días, tras lo cual se cosecharon los medios a 1000 rpm durante 5 minutos y se sometieron a filtrado estéril usando un filtro con baja unión de proteínas de 0,22 µm. Las muestras podrían almacenarse a 4°C tras la adición de 2,5 ml 0,1% PMSF cada 125 ml de medios.

Determinaciones de afinidad – Las determinaciones de afinidad fueron realizadas mediante análisis Scatchard, una prueba ELISA con unión de células y mediante resonancia de plasmón superficial usando BIAcore™-2000 ó A100.

Análisis Scatchard – Se prepararon células IgE/M1' Daudi-humanas, rhesus y de mono cinomolgus para unión en tampón de unión en frío compuesto de medios de base, con 10mM HEPES pH 7,4, y 2% FBS, además de 40ug/ml de IgG humano. Se diluyeron las células a una concentración de 1,7 x 10^6 células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se agregaron al ensayo. Las proteínas/los anticuerpos fueron yodados con método Iodogen. Diversas concentraciones de proteína fría se preparan en triplicado, usando una dilución 1:2 que comienza con la concentración de saturación y que termina con una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. La proteína caliente de una sola concentración se agrega a todas las diluciones para competir con la proteína fría. Por último, las células se agregan a la mezcla de proteínas caliente y fría. Se usaron 250.000 células por muestra. El ensayo se mantiene a 4°C durante 4 horas, con agitación. Cada muestra se colecta entonces y se filtra en una membrana, se lava al menos 3 veces con tampón de unión, se deja secar y luego se cuenta durante 1 minuto usando Perkin Elmer Wizard 1470 Auto Gamma Counter.

Ensayo de unión de células electroquimiluminiscentes competitivas– Se midieron las afinidades de unión relativas de variantes humanizadas usando un ensayo de unión de células electroquimiluminiscentes competitivas. Las células BJAB transfectadas que expresan IgE-M1' (BJAB-IgE/M1')(largo) o las células transfectadas de control que no expresan M1' (BJAB-IgE) (corto) fueron lavadas con salina tamponada con fosfato (PBS) y sembradas usando 25.000 células/pocillo en 25 µl PBS en placas de 96 pocillos MULTI-ARRAY High Bind (Meso Scale Discovery). Las células fueron incubadas en las placas durante una hora a temperatura ambiente para permitir la adherencia de las células a las paredes. Para bloquear la unión no específica, se agregaron 25 µl de FBS al 30% en PBS. Las placas se incubaron entonces a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación leve. La solución de bloqueo fue decantada y se agregaron diluciones en serie de variantes humanizadas (0,022-1333 nM) fueron suplementadas con una cantidad fija de anticuerpo anti-IgE M1' biotinilado (33,3 nM 26A11 ó 47H4) en 25 µl de PBS con FBS al 2% (tampón de ensayo). Tras una hora de incubación a temperatura ambiente con agitación leve, las placas fueron lavadas tres veces con PBS (300 µl/pocillo), usando un lavador de microplacas (ELx405 Select, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT). Se detectaron los anticuerpos unidos agregando 25 µl de 0,25 µg/ml de estreptavidina marcada con rutenio en tampón de ensayo. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas y se agregó Read Buffer T a base de Tris (1x, sin surfactante) (Meso Scale Discovery) (150 µl/pocillo). Se registraron señales electroquimiluminiscentes usando el lector Sector Imager 6000 (Meso Scale Discovery).

Biacore 2000 – Se utilizaron dos orientaciones; se inmovilizaron los M1'-Fc o una variante de anticuerpo en particular (aproximadamente 100 RU, en 10 mM de acetato de sodio con pH 4,8 en un chip sensor CM5) y el ligando correspondiente (variante de anticuerpo o or M1'Fc, respectivamente) sirvió como analito (inyectado con una tasa de flujo de 30 µl/min, usando una dilución en serie doble de 0,5 a 1000 nM en PBST). Se analizó cada una de las muestras con asociación de 3 minutos y disasociación de 10 minutos. Después de cada inyección, se regeneraba el chip utilizando 10 mM de glicina con pH 1,7.

Biacore A-100 – Se inmovilizó M1'- (aproximadamente 100 RU, en 10 mM de acetato de sodio con pH 4,8 en un chip sensor CM-5) y la variante del anticuerpo sirvió como analito (inyectado a una tasa de flujo de 30 µl/min, usando una dilución en serie doble de 0,5 a 1000 nM en PBST). Se analizó cada una de las muestras con asociación de 5 minutos y disasociación de 5 minutos. Después de cada inyección, se regeneraba el chip utilizando 10 mM de glicina con pH 1,7.

Se corrigió la respuesta de unión sustrayendo una célula de flujo de control de las células de flujo IgE de variante 18F7. Para el análisis cinético se utilizó un modelo 1:1 de Languir de encaje simultáneo de las constantes k_{on} y k_{off}.

Resultados y comentarios

Injertos CDR de 26A11, 7A6 y 47H4 – La estructura del aceptor humano utilizada para

humanización se basa en el dominio kappa I VL humano de consenso y en el dominio del subgrupo III VH humano de consenso. Los dominios VL y VH de mu26A11, mu7A6 y mu47H4 fueron alineados con los dominios humanos kappa I y subgrupo III; cada región determinante de complementaridad (CDR) fue identificada e injertada en la estructura del aceptor humano para generar un injerto CDR que pudiera expresarse como IgG (**Figuras 6A-6F**).

Evaluación de afinidad – 26A11.v1, 7A6.v1 y 47H4.v1 fueron evaluados usando una prueba ELISA con enlace de células y resonancia de plasmón superficial (**Tabla 1**). Estos ensayos indicaron que los injertos de CDR presentaron afinidades muy similares a sus anticuerpos de hibridoma respectivos.

Eliminación de deamidación potencial y sitios de formación de ácido isoaspártico en CDR-L1 de 26A11 y 47H4 – A fin de evitar posibles problemas de elaboración, los sitios potenciales de formación de ácido isoaspártico Asn_{28}-Gly_{29} en CDR-L1 de 47H4.v1 y Asn_{31}-Ser_{32} en CDR-L1 de 26A11.v1 fueron eliminados tomando muestras de residuos encontrados en otros anticuerpos en estas posiciones (**Figuras 6A, 6C, Tabla I**). Se determinó que el cambio de Gly_{29} a Ala_{29} en CDR-L1 de 47H4.v1 (47H4.v2 y 47H4.v5), y de Ser_{32} a Tyr_{32} en CDR-L1 de 26A11 (26A11.v3 y 26A11.v6) o Ala_{32} (26A11.v2 o 26A11.v5) eran buenos reemplazos. Además, cambiar Asn_{31} a Ser_{31} (26A11.v13 o 26A11.v15) o Gln_{31} (26A11.v14 or 26A11.v16) sirvió también para eliminar la posible deamidación y formación de ácido isoaspártico y proporcionó a los candidatos afinidades similares a sus anticuerpos de hibridoma respectivos.

La posible oxidación de Met_{34} en CDR-H1 de 26A11.v1 o 47H4.v1 se evitó al cambiar este residuo a Ile_{34} en ambos anticuerpos sin incidir en la unión de M1'.

EJEMPLO 3

Especificidad de anticuerpos anti-M1'

La especificidad de los clones de anticuerpos anti-IgE/M1' fue evaluada en la línea de células B humanas BJAB (ATCC Manassas, VA, #HB-136) transfectadas con IgE con la secuencia M1' ("forma larga") o con IgE sin la secuencia M1' ("forma corta"). Se generaron líneas celulares IgE BJAB mediante transducción retroviral de células BJAB usando un vector de expresión pMSCV (Washington University, St. Louis, MO). Se obtuvo ADNc de cadenas pesada y ligera de extensión completa de receptor celular IgE B humano de la línea celular del mieloma IgE humano U266 (ATCC, Manassas, VA, TIB#196) y fueron subclonadas en el vector retroviral en combinación con una IRES (secuencia de entrada ribosómica interna) para permitir cotransfección y coexpresión bicistrónica de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. A continuación se proporciona otra descripción del método de transducción retroviral.

Se sembraron células de empaque PG13 (ATCC CRL-10686) en una placa de cultivo de tejido de 10 cm a 2 x 10^6 células por placa (glucosa alta DMEM, FBS al 10%, penicilina, estreptomicina, 2 mM L-glutamina) durante 24 horas. Las células fueron transfectadas con constructo de ADN pMSCV usando FuGENE 6 y cultivadas durante 2 días a 37°C, CO2 al 5%. El supernatante de cultivo celular que contiene las partículas retrovirales fue cosechado y filtrado mediante un filtro

de 0,4 micrones. Se agregó sulfato de protamina estéril a una concentración final de 10 µg/ml, y se usaron 4 ml de supernatante para infectar alrededor de 1 x 10^6 células BJAB mediante infección por centrifugado a 32°C durante 90 minutos, seguido por cultivo en supernatante retroviral durante 3-4 horas a 37°C en CO_2 al 5%. Se recuperaron las células BJAB infectadas, se transfirieron al medio de cultivo celular RPMI (RPMI, 10% FBS (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03), penicilina, estreptomicina, 2 mM L-glutamina), y se expandieron para separación. Las células positivamente transfectadas fueron identificadas mediante citometría de flujo usando anticuerpo IgE antihumano MAE11 (Genentech) para detectar el IgE superficial.

Los anticuerpos anti-IgE/M1' son específicos para la forma larga y no para la forma corta de la membrana IgE, según se determina mediante tinción por citometría de líneas celulares de forma corta y larga de IgE BJAB. El anticuerpo de IgE antihumano (Mae11) (Genentech, Inc.) se utilizó como control positivo por su capacidad de unir la forma larga y corta de IgE. Se usaron los anticuerpos anti-gp120 mIgG1 o antiambrosía mIgG2a como controles isotípicos (Genentech, Inc).

Las células BJAB se cultivan en RPMI con FBS al 10% (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03), penicilina/estreptomicina, 2mM L-Glutamina (Genentech, Inc.). 0,5 x 10^6 de células BJAB-largas o BJAB-cortas fueron bloqueadas con suero de ratón (10 µl) (VWR, #RLD108-0100) y humano (10 µl) (Sigma, St. Louis, MO, #S-2257) durante 15 minutos en hielo en 100 µl de tampón de lavado de FACs (FBS al 2% en 1X PBS (Genentech, Inc.). Las células se tiñeron entonces con 1 µg/ml of de cada anticuerpo anti-M1' durante otros 20 minutos en hielo y luego se lavaron con 1 ml de tampón de lavado de FACs y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 100 µl de tampón de lavado FACs y luego se tiñeron con IgG-PE antirratón de cabra (5 µl) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, #M30004-4) en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron como las veces anteriores y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACs para análisis en la máquina FACs Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Todos los anticuerpos evaluados fueron específicos para la forma larga de IgE y no se unieron con las células BJAB-IgE/cortas sobre el control isotípico. Observamos una amplia gama de afinidades relativas basadas en intensidades de tinción.

También evaluamos el anticuerpo anti-M1' que se une a la línea celular U266 (ATCC, Manassas, VA, #TIB196) que expresa naturalmente un nivel bajo de IgE humano que contiene M1' en la superficie celular. Las células U266 se mantienen a alta densidad (1-2x106/ml) en el medio de hibridoma [RPMI 1640, suero de bovino fetal al 15%, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 4,5 g/L glucosa, 1,5g/L bicarbonato]. Las células U266 fueron teñidas con anticuerpos anti-M1' a 1µg/ml. 47H4, 47G4 y 42A5 tiñeron U266 a niveles similares que Mae11. Los anticuerpos 42H4, 45C1 y 28E9 tiñeron U266 a niveles muy bajos. 7A6, 1C11, 26A11, 51D2 y 26B11 no tiñeron U266. (Figura 2C)

EJEMPLO 3A

Especificidad de unión de Anti-IgE/M1'de murino

Las figuras 2D-F muestran la unión de anticuerpos anti-IgE/M1' de murino 47H4, 26A11 y 7A6 a una colección de líneas celulares que expresan el IgE/M1' rhesus-humano o de mono cynomolgus.

La especificidad de clones de anticuerpo anti-IgE/M1' fue evaluada en la línea de células B humanas BJAB (ATCC Manassas, VA, #HB-136) y Daudi (ATCC #CCL-213) infectadas por retrovirus para expresar la forma larga de IgE con la secuencia M1' o la forma corta de IgE sin la secuencia M1'. Las células BJAB se cultivan en RPMI con FBS al 10% (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03), penicilina/estreptomicina, 2mM L-Glutamina (Genentech, Inc.). 0.5 x 10^6 de células BJAB-largas o BJAB-cortas fueron bloqueadas con suero de ratón (10 µl) (VWR, #RLD108-0100) y humano (10 µl) (Sigma, St. Louis, MO, #S-2257) durante 15 minutos en hielo en 100 µl de tampón de lavado de FACs (FBS al 2% en 1X PBS (Genentech, Inc.). Las células se tiñieron entonces con 1 µg/ml de cada anticuerpo anti-M1' durante otros 20 minutos en hielo y luego se lavaron con 1 ml de tampón de lavado de FACs y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 100 µl de tampón de lavado FACs y luego se tiñeron con IgG-PE antirratón de cabra (5 µl) (Caltag/Invitrogen, Carlsbad, CA, #M30004-4) en hielo durante 20 minutos. Las células se lavaron como las veces anteriores y se resuspendieron en 1 ml de tampón de lavado FACs para análisis en la máquina FACs Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Todos los anticuerpos evaluados fueron específicos para la forma larga de IgE y no se unieron con las células BJAB-IgE/cortas sobre el control isotípico. Observamos una amplia gama de afinidades relativas basadas en intensidades de tinción.

La especificidad de los clones de anticuerpos anti-IgE/M1' fue evaluada en la línea de células B humanas Daudi inefectadas con retrovirus para expresar IgE de membrana con la secuencia M1' ("forma larga") o con un IgE de membrana sin la secuencia M1' ("forma corta"). Los anticuerpos anti-IgE/M1' (47H4, 26A11, 7A6) son específicos para la forma larga y no para la forma corta (Figura 2D). Un anticuerpo mIgG1 anti-gp120 fue utilizado como control isotípico (Genentech, Inc).

La línea de células humanas B Daudi fue transducida con el retrovirus que contiene el cassette de IgE humano/M1' primate para el IgE/M1' humano o de rhesus o mono cynomolgus. Tras la transducción, las células que expresan IgE/M1' humano, rhesus o de mono cynomolgus fueron separadas mediante separados FACs a >98% de pureza durante el transcurso de 3-4 separaciones.

La Figura 2F demuestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para unir M1' rhesus y de mono cynomolgus. 47H4 y 7A6 se unen con M1' rhesus y de mono cynomolgus, mientras que 26A11 se une solamente con M1' rhesus.

Además de las líneas celulares transfectantes Daudi, evaluamos el anticuerpo anti-IgE/M1' que se une con U266, línea celular de mieloma de IgE humano (ATCC, Manassas, VA, #TIB196). Las células U266 se mantienen a alta densidad (1-2x106/ml) en el medio de hibridoma [RPMI 1640, suero de bovino fetal al 15%, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 4,5 g/L glucosa, 1,5g/L bicarbonato]. Las células U266 fueron teñidas con anticuerpos anti-M1' a 1 µg/ml. El anticuerpo anti-IgE/M1' 47H4 se unió con U266, mientras que 26A11 y 7A6 no lo hicieron (Figura 2E).

EJEMPLO 3B

Especificidad de unión de anti-IgE/M1' humanizado

El ejemplo 3B muestra la unión de anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados a una colección de líneas celulares que expresan IgE/M1' humano, rhesus o de mono cynomolgus.

Usando las mismas líneas de células B humanas Daudi o BJAB que sobreexpresan M1' humano, rhesus y de mono cynomolgus que se indican en el ejemplo 3A, la especificidad de los clones de anticuerpo anti-IgE/M1' humanizados fue evaluada en la línea de células B humanas Daudi infectada por retrovirus para expresar la forma larga de IgE con la secuencia M1' o la forma corta de IgE sin la secuencia M1'. Los anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados (47H4v5, 26A11v6, 7A6v1) son específicos para la forma larga y no para la forma corta (sin M1') [Figura 2G]. Como control isotípico se usó anti-Her2 MAb huIgG1 de HERCEPTIN® (Genentech, Inc.). Además, los anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados (47H4v5 y 26A11v6) se unen a líneas celulares U266 (Figura 2H).

La Figura 2I demuestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados para unir M1' rhesus y de mono cynomolgus. Los anticuerpos 47H4v5 y 7A6v1 se unen a M1' rhesus y de mono cynomolgus, mientras que 26A11v6 sólo se une a M1' rhesus.

EJEMPLO 4

Afinidad de unión relativa de anticuerpos anti-M1'

Observamos una amplia gama de intensidades de unión de anticuerpos anti-IgE/M1' a 1 µg/ml. Para evaluar las afinidades relativas de estos anticuerpos para el receptor IgE-largo, teñimos células BJAB-largas con una serie de dilución de anticuerpo anti-M1' (1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml). Las células BJAB-largas fueron bloqueadas con suero de raton y humano (10 µl) durante 20 minutos en hielo. Las células fueron teñidas con la cantidad adecuada de anticuerpo anti M1', o controles isotípicos anti-gp120 mIgG1 o antiambrosía mIgG2a durante otros 20 minutos. Las células fueron entonces lavadas en tampón de lavado FACs (1 ml), centrifugadas (1200 rpm durante 5 minutos) y luego resuspendidas en 100 µl de tampón de lavado FACs con anticuerpo IgG-PE antirratón de cabra (5 µl) (CALTAG/Invitrogen, Carlsbad, CA #M30004-4) para realizar la detección. Se volvieron a lavar las células como se describe anteriormente y luego se analizaron en una máquina FACs Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Los ajustes de voltaje se basaron en el control isotípico de 0,001 µg/ml. A partir de estos resultados se ordenaron los candidatos de anticuerpos anti-IgE/M1' de acuerdo con su afinidad de unión relativa:

42H4 > 7A6, 47H4, 47G4 > 42A5, 26A11, 45C1 > 51D2, 26B11 > 1C11 > 28E9

Además de las determinaciones de afinidad relativa mediante titulación de anticuerpos y detección de FACs, determinamos también, usando el análisis Scatchard, afinidades de los anticuerpos anti-M1' seleccionados con líneas celulares BJAB que expresan la forma larga de IgE. Se prepararon células BJAB-largas para unión en tampón de unión fría compuesto de medios de base, con 10mM HEPES pH 7,4, y FBS al 2%, además de 40 µg/ml de IgG humano. Se diluyen las células a una concentración de 1,7 x 10^6 células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se agregan al

ensayo. Los anticuerpos son yodados con el método Iodogen. Diversas concentraciones de anticuerpo sin rotular se preparan en triplicado, usando una dilución 1:2 que comienza con la concentración de saturación y que termina con una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. Se agregó anticuerpo yodado de una sola concentración a todas las diluciones del anticuerpo sin rotular competidor. Por último, se agregaron 250.000 células BJAB-largas a cada mezcla de anticuerpo yodado y sin rotular. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante 4 horas, con agitación. Cada muestra se colectó entonces y se filtró en una membrana, se lava al menos 3 veces con tampón de unión, se dejó secar y luego se midió durante 1 minuto usando Perkin Elmer Wizard 1470 Auto Gamma Counter.

EJEMPLO 4A

Afinidad Scatchard de anticuerpos anti-IgE/M1' de murino

Las células BJAB o Daudi que expresan diversas formas de IgE con o sin M1' (humano, rhesus o mono cynomolgus) se prepararon para unión en tampón de unión fría compuesto de medios de base, con 10mM HEPES pH 7,4, y FBS al 2%, además de 40ug/ml de IgG humano. Se diluyeron las células a una concentración de 1,7 x 10^6 células/ml, y se mantuvieron en hielo hasta que se agregaron al ensayo. Las proteínas/los anticuerpos fueron yodados con el método Iodogen. Diversas concentraciones de proteína fría se preparan en triplicado, usando una dilución 1:2 que comienza con la concentración de saturación y que termina con una concentración de cero, con un total de 14 concentraciones. La proteína caliente de una sola concentración se agrega a todas las diluciones para competir con la proteína fría. Por último, las células se agregan a la mezcla de proteínas caliente y fría. Se usaron 250.000 células por muestra. El ensayo se mantiene a 4°C durante 4 horas, con agitación. Cada muestra se colecta entonces y se filtra en una membrana, se lava al menos 3 veces con tampón de unión, se deja secar y luego se cuenta durante 1 minuto usando Perkin Elmer Wizard 1470 Auto Gamma Counter.

En la Figura 3O se resumen las afinidades de los anticuerpos anti-M1' de murino medidas a través de análisis Scatchard. El anticuerpo de murino 47H4 mIgG1 se unió a M1' humano, rhesus y de mono cynomolgus, con afinidades de 0,79, 0,77 y 0,97 nM, respectivamente. Los anticuerpos de murino 26A11 mIgG1 y 7A6 mIgG1 se unieron a M1' humano con afinidades de 2,3 y 0,64 nM, respectivamente.

La Figura 3P resume las afinidades de unión de los anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados con M1' humano, rhesus y de mono cynomolgus. El anticuerpo humanizado 47H4v5 huIgG1 se unió a M1' humano, rhesus y de mono cynomolgus, con afinidades de 1,5, 1,3 y 2,5 nM, respectivamente. Los anticuerpos humanizados 47H4 v2, 47H4 v1, 26A11 v6, 26A11 v14 y 26A11 v1 se unieron a M1' humano con afinidades de 0,54, 0,37, 1,85, 1,5 y 1,06, respectivamente.

EJEMPLO 5

Estudios de unión/bloqueo de epítopo anti-IgE/M1'

Se realizaron estudios de bloqueo entre candidatos de anticuerpos anti-IgE/M1' para determinar epítopos de unión distintiva o superpuesta. Cuando los anticuerpos de bloqueo y

detección fueron de diferente isotipo (es decir, IgG1 vs. IgG2a), se explotaron estas diferencias para determinar el alcance del bloqueo haciendo la detección con un anticuerpo secundario específico de isotipo (CALTAG/Invitrogen, Carlsbad, CA, IgG1-PE #32004 antirratón de cabra, o IgG2a #M32204 antirratón de cabra). Cuando los anticuerpos de bloqueo y enlace eran de los mismos isotipos, se conjugaron los anticuerpos con Biotin (Pierce, Rockford, IL, EZ-link-sulfo-NHS-LC-Biotin #CAS 127062-220) y se detectaron con etreptavidina-PE (BD #554061), o se conjugaron con Alexa-647 (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, #A20173). Inicialmente, los anticuerpos de bloqueo y detección se utilizaron con una relación de 1:1 (10 µg/ml) (Figura 4A-4B). Se evaluaron nuevamente las combinaciones de anticuerpos que inicialmente no produjeron bloqueo o sólo un bloqueo parcial usando una relación de bloqueo a detección de 10:1. Se bloquearon las células BJAB-largas con suero de ratón y humano (como se describió anteriormente), y luego se tiñeron con el anticuerpo de bloqueo (10 µg/ml) en tampón de lavado FACs (FBS al 2%/1X PBS) durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas en tampón de lavado FACs y luego se tiñeron con el anticuerpo de detección con la relación de 1:1 (10 µg/ml) ó 10:1 (1 µg/ml) durante 20 minutos en hielo. Se volvieron a lavar las células como se describe anteriormente y luego se analizaron en una máquina FACS Calibur (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Las células teñidas se compararon con un anticuerpo de control isotípico anti-gp120 mIgG1 (Genentech, Inc.) o antiambrosía mIgG2a (Genentech, Inc.) (Fig. 4C). A modo de comparación, el bloqueo completo se determinó tiñendo en lo posible con el mismo anticuerpo no conjugado.

Los estudios de bloqueo revelaron tres grupos de unión principales: A, B y C. El grupo A se dividió en dos grupos: A1 (47H4, 47G4, 42H4, 42A5) y A2 (45C1, 51D2, 26A11) en base a epítopos parcialmente superpuestos (Fig. 4D). El grupo C (26B11) presentaba muy poca superposición con otros candidatos de anticuerpo. Tres candidatos presentaban una superposición manera más extensa que los demás. El 1C11 parecía tener superposición de unión con el grupo A1 y A2, y estaba sólo parcialmente bloqueado por el grupo B (28E9). 7A6 pertenece principalmente al grupo A1, pero tenía interacción parcial con los candidatos del grupo A2. 28E9 forma un grupo por sí solo. 28E9 sólo presentaba interacción parcial con los candidatos del grupo A2.

EJEMPLO 5A

Mapeo de epítopos

Las Figuras 5A-E muestran estudios de unión de epítopos realizados usando anticuerpos anti-IgE/M1'. Los anticuerpos de murino 47H4, 7A6 y 26A11 se muestran en las figuras 5B y 5D, mientras que las variantes humanizadas 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6 se muestran en las Figuras 5C y 5E.

Estudios de mapeo de epítopos: candidatos murinos

Se generaron 15 péptidos que abarcan la secuencia que rodea e incluye el M1' humano (Clifford Quan) (Figura 5A). Los péptidos fueron resuspendidos en dH20 o DMSO al 50%. Se recubrió las placas de 96 pocillos (placas ELISA con alta capacidad de unión de proteínas NUNC Maxisorp #44-2404) con péptidos a 1 µg/ml en tampón de revestimiento (0,05M

carbonato/bicarbonato (pH9,6) (100 µl por pocillo). La proteína de fusión M1'-Fc se usó como control positivo de unión. Los controles negativos incluyeron pocillos recubiertos de IgE humano (U266) y pocillos no recubiertos. Se dejó que los péptidos recubrieran los pocillos durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, las placas fueron lavadas 3 veces con tampón de lavado (PBS/ 0,05% Tween-20 (pH 7,4)). A continuación se bloquearon las placas en tampón de bloqueo (PBS, BSA al 0,5% (pH 7,4)) durante 1 hora con agitación suave. Las diluciones de los anticuerpos (40 ng/ml y 1ng/ml) a evaluar (47H4 mIgG1, 47H4v5 huIgG1, 26A11 mIgG1, 26A11v6 huIgG1, 7A6 mIgG1, 7A6v1 huIgG1) se hicieron en Magic Buffer [PBS (pH7,4), BSA al 0,5%. 0,05% Tween-20, 10 ppm Proclin., 0,2% BgG, 0,25% Chaps, 5 mM EDTA, 0,35M NaCl]. Se usaron anticuerpos anti-gp120 mIgG1 y HERCEPTIN® huIgG1 como controles de anticuerpos anti-IgE/M1' murinos y humanos, respectivamente. Una vez que las placas estuvieron suficientemente bloqueadas (BSA al 0,5%/1X PBS), las placas fueron lavadas 3 veces, y entonces se agregaron los anticuerpos a la placa en triplicado (100 µl por pocillo). Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces las placas de anticuerpos de murino y luego se agregó IgG1-Biotina de antirratón (BD Biosciences (A85-1) #553441) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Al cabo de 3 lavados, se agregó SA-HRP (BD Biosciences #554066) (1:20.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora. Se lavaron las placas de anticuerpo IgG1 humano como en el caso anterior y se agregó anti-huIgG.Fc-HRP (Jackson ImmunoResearch (#109-036-098)) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez concluidas las incubaciones secundarias, las placas se lavaron 6 veces y se agregó sustrato TMB (BD OptEIA #555214) (100 µl por pocillo). La reacción de sustrato-HRP se detuvo con 1M H3PO4 tras ~4 minutes. Se leyeron entonces las placas a 450/650. Los datos se presentaron como OD (OD450 / CD650) relativo.

Las Figuras 5B y 5D ilustran la unión de los candidatos murinos 47H4, 26A11 y 7A6 anti-IgE/M1' a los péptidos M1'. La unión de estos candidatos guarda correlación con el agrupamiento de epítopos definidos en estudios de bloqueo de anticuerpos. 47H4 mIgG1 se unió al péptido 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (Núm. identif. secuencia:8). 7A6 mIgG1 se une a péptidos 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (Núm. identif. secuencia:8) y 5 (RAPDRVLCHSGQQQG) (Núm. identif. secuencia:9). 26A11 mIgG1 se unió a péptidos 7 (GQQQGLPRAAGGSVP) (Núm. identif. secuencia:11) y 8 (PRAAGGSVPHPRCH) (Núm. identif. secuencia:12).

Las Figuras 5C y 5E ilustra la unión de anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados a péptidos M1'. El mapeo de epítopos se realizó como se describió anteriormente para los anticuerpos murinos correspondientes, excepto que se usó un anticuerpo secundario diferente. Se lavaron las placas de anticuerpo IgG1 humano como en el caso anterior y se agregó anticuerpo secundario anti-IgG.Fc-HRP (Jackson ImmunoResearch (#109-036-098)) (1:10.000, 100 µl por pocillo) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La unión de epítopos es similar a la observada con los anticuerpos de murino parentales. 47H4 v5 mIgG1 se une al péptido 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (Núm. identif. secuencia:8). 7A6 v1 se une a péptidos 4 (SAQSQRAPDRVLCHS) (Núm. identif. secuencia:8) y 5 (RAPDRVLCHSGQQQG) (Núm. identif. secuencia:9). 26A11 mIgG1 se unió a

péptidos 7 (GQQQGLPRAAGGSVP) (Núm. identif. secuencia:11) y 8 (PRAAGGSVPHPRCH) (Núm. identif. secuencia:12).

EJEMPLO 6

Inducción de apoptosis por anti-IgE/M1' murino en células Daudi-IgE/largas

Se usaron células Daudi-largas (IgE/M1') para evaluar el efecto del IgE superficial reticulante sobre la inducción de apoptosis. Las células (ATCC, Manassas, VA, #CCL-213) son una línea celular de linfoma Burkitt humano conocida por ser susceptible a la apoptosis en respuesta a reticulación BCR. Las células Daudi que expresan la forma larga de IgE fueron generadas mediante transducción retroviral de las cadenas pesada y ligera U266 de IgE con M1', como se describe anteriormente para la generación de células largas BJAB IgE. El análisis de citrometría de flujo de células Daudi-IgE/largas usando anticuerpos contra IgM endógeno y receptor celular IgE B transfectado indica una mayor expresión de IgM que de IgE. Se estudió la apoptosis de células Daudi-IgE/largas en células cultivadas con una densidad de 0,2 x 10^6 / 1,5ml en medio de cultivo [RPMI, FBS al 10% (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03), penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #15140-122), 2 mM de glutamina (Genentech, Inc.), 10 mM HEPES (7,2) (Genentech, Inc.), 1 mM NaPiruvato (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #11360), 1,59 g/L de solución de bicarbonato de sodio (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #25080-094)]. Antes del comienzo del ensayo de apoptosis, se removieron células muertas sobre una gradiente ficoll (GE Healthcare #17-1440-03) para reducir los niveles subyacentes de muerte celular en el ensayo. Se cultivaron 0,2 x 10^6 células en triplicado con y sin anticuerpos anti-M1' ni anticuerpos de control en solución durante 72 horas. Las células se cosecharon y analizaron entonces para determinar niveles de apoptosis usando el V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San José, CA #556547). Las células se lavaron dos veces en PBS fría (Genentech, Inc.) y luego fueron resuspendidas en 100 µl 1X de tampón de unión (0,1 M Hepes / NaOH (pH7.4), 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$) (BD Biosciences, San José, CA, #51-66121E). Las células se tiñeron entonces con 2,5 µl de anticuerpo Annexin V-FITC (BD Biosciences, San José, CA #51-65874X) y 5 µl de yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences, San José, CA #51-66211E) a oscuras. Al cabo de 15 minutos, se agregaron 400 µl de tampón de unión 1X a cada tubo y las células fueron analizadas en una máquina de citometría de flujo FACs Calibur (BD, Inc. Franklin Lakes, NJ). Para cada muestra se colectaron aproximadamente 10-20.000 episodios. Las células agonizantes se definen como positivas en cuanto a Annexin-V y negativas en cuanto a PI. Las células muertes son positivas en cuanto a Annexin-V y PI. El porcentaje de cada población (muerta y agonizante) se calculó usando el software de análisis FlowJo FACs (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Los datos en triplicado se promediaron y se calcularon las desviaciones estándares. El porcentaje de apoptosis se calculó como la suma de células muertas y agonizantes y se graficó usando Excel (Microsoft, Inc.).

Se usaron camptotecina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, #C9911-100mg) y anticuerpo anti-IgM (JacksonImmuno Research, West Grove, PA, #109-006-120) como controles positivos para inducir apoptosis en la línea de células Daudi-IgE/largas. Los anticuerpos mIgG1 anti-gp120 o antiambrosía (Genentech, Inc.) se usaron como controles negativos para este ensayo. Las células

Daudi-IgE/largas se cultivaron con un rango de concentraciones de anticuerpos Anti-IgE/M1' o de control isotípico (25, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 µg/ml). Los anticuerpos anti-IgE/M1' evaluados fueron 7A6, 47H4, 47G4, 42A5, 42H4, 1C11, 26A11, 51D2, 45C1, 26B11 y 28E9 (Genentech, Inc.). El anticuerpo IgE antihumano (Mae11-mIgG1) se usó también como comparación.

Los anticuerpos de control isotípico anti-gp120 y antiambrosía no indujeron apoptosis sobre células no tratadas. Los niveles subyacentes de apoptosis estuvieron en el rango de 10-15% para cada experimento. Los anticuerpos anti-IgE/M1' 7A6 (>10 µg/ml), 47H4 (>10 µg/ml) y 47G4 (25 µg/ml) indujeron apoptosis de células largas Daudi IgE. 26A11 indujo magnitudes similares de apoptosis (~30-50%), pero a concentraciones mucho menores (>0,1 µg/ml). 42A5, 51D2, 45C1, 26B11 y 28E9 no indujeron apoptosis sobre los niveles subyacentes. Mae11 tampoco indujo apoptosis sobre los niveles subyacentes.

También realizamos el ensayo de apoptosis en presencia de un anticuerpo secundario IgG $F(ab')_2$ antirratón de cabra (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA #115-006-062) para reticular el receptor de células B IgE sobre la línea de células Daudi. Los experimentos de reticulado se realizaron en presencia del anticuerpo IgG $F(ab')_2$ antirratón de cabra (30 µg) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, #115-006-062). Con la excepción de 26B11 (30%), todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos de 70-80%, pero con diferentes concentraciones. Estos anticuerpos pueden clasificarse en dos grupos. 7A6, 1C11, 26A11, 51D2, 45C1 y 28E9 indujeron apoptosis máxima con las concentraciones más altas. El otro grupo 47H4, 47G4, 42A5 y 42H4 y MAE11 presentó una apoptosis menor con concentraciones más altas.

EJEMPLO 6A

Inducción de apoptosis de anticuerpos anti-IgE/M1' humanizados en células Daudi-IgE-largas

Se usaron células Daudi-largas (IgE/M1') para evaluar el efecto del IgE superficial reticulante sobre la inducción de apoptosis en esta línea celular. Las células (ATCC, Manassas, VA, #CCL-213) son una línea celular de linfoma Burkitt humano conocida por ser susceptible a la apoptosis en respuesta a reticulación BCR. Se estudiaron células Daudi-IgE/largas cultivadas cultivadas con una densidad de 0,2 x 10^6 / 1,5 ml en medio de cultivo [RPMI, FBS al 10% (Hyclone, Logun, UT, #SH30071.03), penicilina/estreptomicina (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #15140-122), 2 mM de glutamina (Genentech, Inc.), 10 mM HEPES (7,2) (Genentech, Inc.), 1 mM NaPiruvato (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #11360), 1,59 g/L de solución de bicarbonato de sodio (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA #25080-094)] la noche anterior y luego se removieron las células muertes sobre una gradiente ficoll (GE Healthcare #17-1440-03) al día siguiente. Esto redujo los niveles subyacentes de muerte celular en el ensayo. Se cultivaron 0.2 x 10^6 células en triplicado con y sin anticuerpos anti-M1' ni anticuerpos de control en solución durante 72 horas. Las células se cosecharon y analizaron entonces para determinar niveles de apoptosis usando el V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences, San José, CA #556547). Las células se lavaron dos veces en PBS fría (Genentech, Inc.) y luego fueron resuspendidas en 100 µl 1X de tampón de unión (0,1 M Hepes / NaOH (pH7.4), 1,4 M NaCl, 25 mM $CaCl_2$) (BD Biosciences, San José, CA, #51-66121E). Las células se tiñeron entonces con 2,5 µl de anticuerpo Annexin V-FITC (BD Biosciences, San José, CA #51-65874X) y 5 µl de yoduro de propidio (PI) (BD Biosciences, San José,

CA #51-66211E) a oscuras. Al cabo de 15 minutos, se agregaron 400 µl de tampón de unión 1X a cada tubo y las células fueron analizadas en una máquina de citometría de flujo FACs Calibur (BD, Inc. Franklin Lakes, NJ). Para cada muestra se colectaron aproximadamente 10-20.000 episodios. Las células agonizantes se definen como positivas en cuanto a Annexin-V y negativas en cuanto a PI. Las células muertes son positivas en cuanto a Annexin-V y PI. El porcentaje de cada población (muerta y agonizante) se calculó usando el software de análisis FlowJo FACs (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Los datos en triplicado se promediaron y se calcularon las desviaciones estándares. El porcentaje de apoptosis se calculó como la suma de células muertas y agonizantes y se graficó usando Excel (Microsoft, Inc.).

Se usó un anticuerpo anti-IgM (JacksonImmuno Research, West Grove, PA, #109-006-120) como control positivo para inducir apoptosis en la línea de células Daudi-IgE/largas. Se usó HERCEPTIN® huIgG1 (Genentech, Inc.) como control negativo para este ensayo. Las células Daudi-IgE/largas se cultivaron con un rango de concentraciones de anticuerpos Anti-IgE/M1' o de control isotípico (25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 µg/ml). Se realizaron experimentos de reticulación secundaria en presencia de un anticuerpo IgG $F(ab')_2$ antihumano (50µg) (Biosource #AHI1301). Los anticuerpos anti-IgE/M1' evaluados fueron 47H4v5, 26A11 v6, 7A6v1 huIgG1.

El control isotípico HERCEPTIN® huIgG1 no indujo apoptosis sobre células no tratadas. Los niveles subyacentes de apoptosis estuvieron en el rango de 10-15% para cada experimento. Los anticuerpos anti-IgE/M1' 47H4 v5, 26A11v6 y 7A6v1 indujeron apoptosis en el rango de 30-40% (Figura 8A).

Repetimos los mismos ensayos en presencia de un anticuerpo secundario IgG F(ab')2 antihumano (Biosource #AHI1301) para reticular el receptor IgE en la línea de células Daudi. Todos los anticuerpos indujeron niveles apoptóticos máximos de 70-90%, con algún aumento en actividad apoptótica con concentraciones altas de anticuerpo anti-IgE/M1' primario (Figura 8B).

47H4v5 salvaje vs. afucosilado en la inducción de apoptosis sin reticulado secundario

Una versión afucosilada (AF) de 47H4 v5 se produjo usando líneas celulares BIOWA (Genentech, Inc.). Tanto las versiones WT (salvajes) y AF de 47H4 v5 pudieron inducir apoptosis a niveles similares (Figura 8C).

Tabla 1

Afinidades de unión de anti-IgE/M1' humanizado

	Cambios de secuencias			Scatchard	BJAB-IgE unión de células		Biacore A100	Biacore 2000	
	L1-31/32	H1-34/35		KD (nM)	IC50 (nM)	IC50 (nM)	M1' inmovilizado KD (nM)	M1' inmovilizado KD (nM)	IgE inmovilizado KD (nM)
mu26A11	NS	MM		1.6 nM	12	25 /26	0,3		5,1
26A11.v1	NS	MM			15	19	0,2	1,7	9,0
26A11.v2	NA	MM			18		0,3		
26A11.v3	NY	MM			10	22	0,0	2,8	
26A11.v4	NS	IM			20	29	0,9		
26A11.v5	NA	IM			25	35			
26A11.v6	NY	IM			11	23	2,6		8,3
26A11.v7	NS	IH				890		muy débil	
26A11.v10	NS	IN			~3300		1064		
26A11.v11	NA	IN			~540		21364		
26A11.v12	NY	IN			~1200				
26A11.v13	SS	MM				19		4,0	
26A11.v14	QS	MM				19		3,9	
26A11.v15	SS	IM				32		8,4	
26A11.v16	QS	IM				27		8,8	
	L1-27e/28	H1-34	H3-100k						
mu47H4	NG	M	M	0,4 nM	62	57	5 6	12	1,5
47H4.v1	NG	M	M		12	18	7 8		3,1
47H4.v2	NA	M	M		38		7 4		2,8
47H4.v3	NG	I	L		~7600		69		
47H4.v4	NA	I	L		>1300		56		
47H4.v5	NA	I	M			60		23	
47H4.v6	NA	M	L			170		54	
	H1-34	H3-100k							
mu7A6	M	M		0,6 nM	52		4,5		
7A6.v1	M	M			39		15		
7A6.v2	I	L			~370		571		

EJEMPLO 7

Flujo de calcio inducido

Investigamos la capacidad de los anticuerpos anti-M1' de inducir el flujo de calcio en células Daudi-IgE/largas como prueba de que estos anticuerpos pueden inducir señales celulares hacia la derecha del 3' del receptor de células B de IgE. Las células Daudi (ATCC, Manassas, VA, #CCL-213) que sobreexpresan la forma larga de IgE/M1' fueron cultivadas durante toda la noche con una densidad ligera de 0,2 x 10^6/ml. A la mañana siguiente se removieron las células muertas sobre una gradiente ficoll (GE Healthcare #17-1440-03). Las células se cargaron con Indo-1 a granel para garantizar una carga uniforme entre todos los estímulos. Las células se resuspendieron a 5 x 10^6/ml en medio de cultivo (RPMI-10% FBS (Hyclone), penicilina/estreptomicina, 2 mM L-glutamina) y se combinaron con la tintura de detección de calcio Indo-1 (5 μM) (Molecular probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, #I1223). Las células se lavaron entonces en medios de cultivo y se resuspendieron a 10^6/ml. Se usaron 10^6 por estímulo. Las muestras se calentaron en un baño de agua de 37°C durante 5 minutos antes de ponerlas en una máquina FACs Vantage (BD, Inc, Franklin Lakes, NJ). Las muestras se dejaron correr inicialmente durante 1 minuto para generar un valor de referencia y luego las muestras fueron estimuladas con 20 μg de cada anticuerpo, excepto en el caso de anti-IgM (10 μg). Se recopilaron datos durante 8-10 minutos. Se realizó un análisis cinético con software de análisis FlowJo FACs (Tree Star, Inc., Ashland, Oregón). Los datos se informan como la relación de Indo-1 405 unido / Indo-1 1530 libre. Todos los anticuerpos anti-M1' fueron comparados con el control isotípico anti-gp120 mIgG1 (20 μg). Se utilizó IgM antihumano (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA, #109-005-129) y anti-IgE (Mae11, Genentech, Inc.) como controles positivos. 7A6, 47H4, 47G4, 26A11 y 1C11 indujeron un flujo de calcio en células largas Daudi IgE. 28E9 y 42A5 indujeron niveles bajos de flujo de calcio. 45C1, 26B11 y 51D2 no indujeron flujo de calcio.

EJEMPLO 8

Inducción de ADCC por Anti-IgE/M1' 47H4 v5 salvaje y afucosilado

La toxicidad mediada por células dependiente del antibiótico permite que las células citotóxicas se unan (a través del anticuerpo) a la célula diana que se une con el antígeno y, posteriormente, que elimine la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos anti-IgE/M1' que presenten actividad ADCC o actividad ADCC potenciada pueden tener un mayor valor terapéutico en el tratamiento de trastornos mediados por IgE.

Se ha descubierto que los anticuerpos producidos en células de mamíferos que son afucosiladas presentan una mayor actividad de ADCC. El siguiente experimento describe la producción de anticuerpo anti-IgE/M1' afucosilado.

Se aislaron células NK de 100 ml de sangre entera (RosetteSep #15065, Stem Cell Technologies). La pureza de las células NK se determinó mediante tinción CD56 antihumana. En cada ensayo se usaron células CD56+ NK >70% puras. Los anticuerpos anti-IgE/M1' y el control isotípico HERCEPTIN® anti-Her2 MAb huIgG1 fueron tratados en serie. Estos anticuerpos (50 µl) fueron incubados con células BJAB que sobreexpresan IgE/M1' humano en la superficie celular durante 30 minutos a temperatura ambiente en RPMI-1640 (sin rojo fenol) (BioWhitaker #12-918F) con FBS al 1% (línea celular generada como se describe anteriormente). Las células NK (50µl) fueron entonces añadidas a la línea celular con una relación de 15:1 (150.000 células NK a 10.000 dianas (BJAB-Long)). Los ensayos fueron hechos en triplicado. BJAB-huLong, anticuerpos y células NK fueron entonces incubados durante 4 horas a 37°C. Tras el cultivo, placas con fondo en U de 96 pocillos fueron hechas girar y se cosecharon los supernatantes (100µl). A continuación se evaluaron los supernatantes para determinar la liberación de LDH usando el ensayo de reacción LDH (Roche #1644793). Se usaron la diana única y diana lisada para calcular el porcentaje de citotoxicidad. Se incubaron los supernatantes a un volumen equivalente con la mezcla de reacción LDH, como lo indica el fabricante, durante 30-60 minutos. Se leyeron entonces las placas a 490 nm. El porcentaje de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera: = (Valor previsto – Diana única) / diana lisada – Diana única). Los datos se graficaron usando Kaleidagraph y se usaron las curvas de mejor ajuste para generar valores ED50.

En la Figura 10, el anticuerpo de control isotípico huIgG1 de HERCEPTIN® indujo una citotoxicidad de bajo nivel. Los anticuerpos anti-IgE/M1' indujeron citotoxicidad específica. Las formas salvaje y afucosilada de anti-IgE/M1' 47H4v5 indujeron un porcentaje máximo de citotoxicidda similar (~ 70-80%). El 47H4v5 afucosilado fue más potente que la forma salvaje (el EC50 del 47H4v5 afucosilado fue ~0,83 nM; el EC50 del salvaje 47H4v5 fue ~6,6 nM).

EJEMPLO 9

Efecto de anticuerpos anti-IgE/M1' de murino en ratón hu-SCID atópico

En las Figuras 12A y 13A se demuestra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' (de murino y humanizados, respectivamente) para inhibir la producción de IgE sérico y de células plasmáticas productoras de IgE en un modelo de hu-SCID atópico. En el experimento 1 (#07-0377) se evaluaron candidatos a anti-IgE/M1' murino y en el experimento 2 (#07-1232) se evaluó un candidato a anti-IgE/M1' humanizado.

Se analizó en los donantes los niveles de IgE sérico a través de nuestro programa de donantes de sangre Leukopack interno. Dos donantes seleccionados para proporcionar células para el modelo hu-SCID atópico indicaron tener alergias y niveles IgE séricos de 1696 y 1152 ng/ml. Habitualmente, los donantes tienen un IgE que varía de <100 a 300 ng/ml.

Los experimentos hu-SCID se describen en las Figuras 12A y 13A. Se aislaron las PBMC mediante leucoforesis y gradiente de densidad de ficoll (GE Healthcare #17-1440-03) y se contaron. Se inyectaron 10^8 células PBMC (10^8 por 100µl) i.p. en ratones SCID-beige irradiados el día cero. Para inclinar la respuesta hacia la producción de IgE, se trató a los ratones con anticuerpos anti-IFNγ (BD Biosciences, San José, CA, #554698) y anti-IL12 (100µg/dosis) (BD Biosciences, San José, CA, #554659) los días 0 y 3; y rhIL-4 (100ng/dosis) (R&D Systems, Minneapolis, MN, #204-IL-010) los días 2,3,4. Se trató a los ratones con anticuerpos experimentales (*es decir,* anti-IgE/M1') tres veces por semana (aproximadamente cada tres días) empezando el día 0 hasta el final del estudio. Se permitió que las células humanas se expandieran entre 7 y 14 días, tras lo cual los ratones fueron eutanizados. Se extrajo sangre el día 7 y al final del estudio. El último día del experimento, los ratones fueron eutanizados y se aislaron las células del bazo. Se utilizaron suspensiones de células únicas para el ensayo Elispot de IgE y FACs para determinar el alcance de la reconstitución de células humanas y de eliminación de células plasmáticas de IgE.

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. Los valores P fueron calculados usando software de estadística JMP. La prueba de Dunnett compara medias de grupo en que todas los grupos de prueba son evaluados respecto de un grupo de referencia. La t de Student de cada par compara cada par de grupos usando la prueba t de Student. Se aplica entonces una corrección de Bonferroni para ajustar los valores p de la t de Student de cada par para protegerse contra comparaciones de pares. El umbral de valor p es de 0,05. El cambio porcentual en los datos referidos en las Figuras 12 A-I y 13 A-H fue calculado entre grupo de tratamiento y grupo de control sin normalización a niveles de valor de referencia.

Se determinaron los niveles de IgE libre usando un procedimiento ELISA humano en el que se recubrieron las placas ELISA de 384 pocillos Maxisorp (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal MAE11 en 50 mM de tampón de carbonato, pH 9,6, a 4°C durante la noche y se bloquearon con albúmina sérica de bovino al 0,5%, en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Las diluciones en serie estándares (0,098-12,5 ng/ml) y triples de muestras (dilución mínima 1: 10 para evitar cualquier efecto en el suero) se incubaron en las placas a temperatura ambiente durante 1 hora en PBS con albúmina sérica de bovino al 0,5%, polisorbato 20 al 0,05%, 10 partes por millón de Proclina 300 (Supelco, Bellefonte, PA), CHAPS al 0,25% (Sigma, St. Louis, MO), g-globulinas de bovino al 0,2% (Biocell, Rancho Domínguez, CA) y 5 mM EDTA. El IgE unido fue detectado incubando anticuerpo IgE antihumano de cabra con etiqueta de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) en los pocillos durante 1 hora. Se agregó el sustrato 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y la reacción fue detenida añadiendo ácido fosfórico 1 M. Las placas fueron lavadas entre pasos. La absorbancia se analizó en un lector Titertek (ICN, Costa Mesa, CA) y arrojó una lectura de 450 nm. La curva estándar se ajustó usando un programa de ajuste de curvas con regresión no lineal de cuatro parámetros (diseñado en Genentech). Los puntos de datos que se ubicaron

dentro del rango lineal de la curva estándar se utilizaron para calcular la concentración de IgE en las muestras.

Se realizó el panel isotípico de inmunoglobulina humana llevando anticuerpo monoclonal de ratón (mAb) a IgG1 humano (clon 2C11, Abcam Inc., Cambridge, MA), se diluyó a 4 ug/ml en 0,05M de tampón de carbonato de sodio, pH 9,6, y se recubrieron con esto las placas ELISA (placas de 384 pocillos, de alta unión, Greiner Bio One, Monroe, NC) en una incubación durante toda la noche a 4°C. Tras lavarlas 3 veces con tampón de lavado (PBS / 0,05% Tween-20), las placas fueron bloqueadas con PBS / albúmina sérica de bovino (BSA) al 0,5% durante 1 a 2 horas. Ésta y todas las demás incubaciones se realizaron a temperatura ambiente en un agitador orbital. Se diluyeron las muestras de suero de ratón 1:100, seguido de diluciones 1:3 en serie usando tampón de ensayo (PBS / BSA al 0,5% / Tween 20 al 0,05% / CHAPS al 0,25% / 5mM EDTA / 15PPM Proclina). Usando el mismo tampón, se prepararon diluciones en serie de IgG1 para la curva estándar (12,20-1560 ng/ml). Se descongelaron los controles prediluidos en las regiones alta, media y baja de la curva estándar. Tras el paso de bloqueo, las placas se lavaron y las muestras, los estándares y los controles fueron añadidos a las placas de 384 pocillos e incubadas durante 2 horas. Las placas fueron lavadas y se diluyó el IgGe de mAb de ratón biotinilado a humano (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 1:500 en tampón de ensayo y se añadió a las placas lavadas para incubación durante 1 hora. Se diluyó la estreptavidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) (GE Healthcare, Piscataway, NJ) 1:40.000 en tampón de ensayo y se añadió a las placas tras el lavado. Tras una incubación de 30min y de un paso de lavado final, se añadió tetrametilbenzidina (TMB) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y se reveló el color durante 10 a 15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo ácido fosfórico 1M. La densidad óptica se obtuvo usando un lector de microplacas (450 nm, longitud de onda de 650 nm), y las concentraciones de muestras se calcularon a partir de ajustes de 4 parámetros de las curvas estándares. La concentración cuantificable mínima de IgG1 humano en las muestras de suero de ratón fue de 1,22 ug/ml.

Este método ELISA general descrito anteriormente se usó también para el análisis de los otros isotipos de Ig.

IgG2

Se usó IgG2 mAb antihumano de ratón (específico de cadena γ_2) (Southern Biotech, Birmingham, AL) para recubrir placas de ELISA a 4 ug/ml. El rango de la curva estándar de IgG2 humano fue de 12,20-1560 ng/ml. Se diluyó el IgG2 mAb antihumano de ratón biotinilado (específico de cadena γ_2) (Southern Biotech) a 0,5 µg/ml y se usó como anticuerpo de detección. Se agregó SA-HRP a las placas de 384 pocillos con una dilución de 1:10.000. La concentración cuantificable mínima de IgG2 humano en las muestras de suero de ratón fue de 1,22 µg/ml.

IgG3

Se diluyó IgG3 mAb antihumano de ratón (Zymed Laboratories) a 1 µg/ml y se usó para recubrir placas de ELISA. El rango de la curva estándar de IgG3 humano fue de 0,78-100 ng/ml. Se diluyó el IgG3 mAb antihumano de ratón biotinilado γ_3) (Southern Biotech) a 0,1 mg/ml y se usó como anticuerpo

de detección. Se agregó SA-HRP a las placas de 384 pocillos con una dilución de 01:20.000. La concentración cuantificable mínima de IgG3 humano en las muestras de suero de ratón fue de 78,1 µg/ml.

IgG4

Se diluyó IgG4 mAb antihumano de ratón purificado (BD Pharmingen, San José, CA) a 0,25 µg/ml y se usó para recubrir placas de ELISA. El rango de la curva estándar de IgG4 humano fue de 0.20-25 ng/ml. Se diluyó IgG4 mAb antihumano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 0,25 µg/ml y se usó como anticuerpo de detección. Se agregó SA-HRP a las placas de 384 pocillos con una dilución de 01:20.000. La concentración cuantificable mínima de IgG4 humano en las muestras de suero de ratón fue de 39,1 ng/ml.

IgA

Se diluyó IgA_1/A_2 mAb antihumano de ratón purificado (BD Pharmingen) a 2 µg/ml y se usó para recubrir placas de ELISA. El rango de la curva estándar de IgA humano fue de 0,20-25 ng/ml. Se diluyó IgA_1/A_2 mAb antihumano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 1 µg/ml y se usó como anticuerpo de detección. Se agregó SA-HRP a las placas de 384 pocillos con una dilución de 1:80.000. La concentración cuantificable mínima de IgA humano en las muestras de suero de ratón fue de 39,1 ng/ml.

IgM

Se diluyó IgM mAb antihumano de ratón purificado (BD Pharmingen) a 0,5 µg/ml y se usó para recubrir placas de ELISA. El rango de la curva estándar de IgM humano fue de 0,78-100 ng/ml. Se diluyó IgM mAb antihumano de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen) a 0,5 µg/ml y se usó como anticuerpo de detección. Se agregó SA-HRP a las placas de 384 pocillos con una dilución de 1:40.000. La concentración cuantificable mínima de IgM humano en las muestras de suero de ratón fue de 156 ng/ml.

Se contaron los esplenocitos hu-SCID, los esplenocitos de ratón o las células de nódulos linfáticos usando microesferas Fluoresbrite YG (Polysciences, Inc. #18862) en un FACs Calibur Flow Cytometer (BD (San José, CA)).

Se usaron ensayos Elispot para determinar la frecuencia de células plasmáticas productoras de IgE en ratones hu-SCID tras el tratamiento anticuerpos con rhuIL-4, anti-IFNγ y anti-IL-12 durante 15 días. Las placas Elispot (Millipore, Billerica, MA, #MSIPS4510, transparentes) se recubrieron con una dilución de 1:500 de anticuerpo IgE antihumano no conjugado primario (AXXORA, San Diego, CA, #BET-A80-108A) en tampón de revestimiento [Genentech, Inc. (A3323)] a 100 µml/pocillo durante toda la noche a 4°C. La solución de anticuerpo primario se decantó entonces y las placas fueron lavadas dos veces con tampón de lavado (1X PBS, 0.05% Tween-20). Las membranas fueron bloqueadas con 200 µl/well de BSA al 0,5% en 1X PBS durante 0,5-1 hora a 37°C. La solución de bloqueo se removió y se agregaron las células de control positivo o los esplenocitos hu-SCID a la placa. Se usó el la línea celular U266 productora del IgE de mieloma humano (ATCC, Manassas, VA, #TIB196) como control positivo para el ensayo. Se agregaron células U266 a la placa comenzando con una concentración de

3000 células/0,1ml (=0,032x10^6/ml) de medio de hibridoma [RPMI 1640, suero bovino fetal al 15%, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 4,5 g/L glucosa, 1,5g/L bicarbonato] y luego siete diluciones en serie (1:2). Las suspensiones de célula única de bazo completo fueron resuspendidas en medios de 1 ml. Se agregaron 100 µl al primer pocillo. Se realizaron entonces siete 1:2 diluciones en serie. Se incubaron células U266 de hibridoma y bazo durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (1XPBS, 0,05% Tween-20) y luego se agregaron 100 µml/pocillo del anticuerpo secundario, IgE antihumano conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma, St. Louis, MO, A-3525) a 1:2000 en BSA al 0.5% / 1X PBS a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 2 horas. Las placas se lavaron tres veces y luego se enjuagaron una vez con ddH_20 (Genentech, Inc.). Se añadieron 100 µl/pocillo de solución BCIP/NBT (R&D Systems, Minneápolis, MN, Elispot Blue Color Module, #SEL002) a cada pocillo y luego se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. Las placas se enjuagaron entonces con ddH20 una vez y se dejó que la placa se secara a temperatura ambiente. Se enviaron las placas a BD Biosciences para realizar conteos (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ). Se calculó la cantidad de células plasmáticas usando la cantidad de manchas detectadas, el nivel de dilución (entrada celular) y el conteo total de células de bazo.

Se prepararon células de plasma humano removiendo el día 15 los bazos de ratones hu-SCID tratados con antibióticos. Se prepararon y filtraron suspensiones de células únicas. Se bloquaron células con una concentración de 5 x 10^6 con suero humano (Sigma, St. Louis, MO, #S-2257) y de ratón (VWR, #RLD108-0100), y luego se tiñeron con anticuerpos CD38 PE antihumanos (BD Biosciences, San José, CA, #555460) y PC FITC antihumanos (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca, #K2311) en tampón de lavado FACs (FBS al 2%, 1X PBS) en hielo durante 20 minutos. Se lavaron entonces las células y se analizaron en una máquina FACs Calibur (BD, Inc., Franklin Lakes, NJ). La expresión de CD38 humano se usó como control positivo para la transferencia exitosa de PBMC humanas. Las células plasmáticas se definieron como CD38 altas, PC+.

En el experimento #07-0377 (Figura 12A), se evaluaron tres anticuerpos anti-IgE/M1' (47H4, 26A11 y 7A6) contra el anti-gp120-muIgG1 de control isotípico. Los ratones tratados con el control isotípico generaron altos niveles de IgE humano para el día 9. El tratamiento con candidatos de anti-IgE/M1' redujo los niveles de IgE en un 65-84% (Figuras 12 B-C). El tratamiento con anti-IgE/M1' redujo también las células productoras de IgE in vivo en 19-69% (Figura 12 D-E). Otros Igs séricos se vieron relativamente no afectados por el tratamiento anti-IgE/M1' (reducciones de ~30% fueron observadas con algunos anticuerpos anti-M1' para huIg1, IgG3 y IgG4 (Figura 12 F-G). No se observó reducción en el porcentaje células plasmáticas totales del bazo con el tratamiento anti-IgE/M1' (Figura 12 H-I).

En el experimento #07-1232 (Figura 13A), se evaluó un anti-IgE/M1' humanizado (47H4v5) contra el anticuerpo de control isotípico HERCEPTIN®-huIgG1. Los ratones tratados con el control isotípico generaron altos niveles de IgE sérico para el día 8. El tratamiento con anti-IgE/M1' huIgG1 redujo los niveles de IgE en 79% (Figura 13 B-D) y de células plasmáticas productoras de IgE en 75% (Figura 13 C-D). No se observó ninguna reducción en otros Ig séricos (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA) (Figura 13 E-F) ni en el porcentaje de células plasmáticas totales en el bazo (Figura 13 G-H). Estos

estudios demuestran que los anticuerpos anti-IgE/M1' reducen específicamente el IgE sérico y de células productoras de IgE, pero no las inmunoglobulinas de otros isotipos.

EJEMPLO 10

Ratón transgénico con M1' humano

Generación de ratones "knockin" transgénicos huM1'

Dado que los ratones no expresan normalmente un dominio M1' similar al de los humanos, generamos ratones con el dominio M1' humano insertado ("knocked into") en el locus IgE del ratón (Figura 14A). La secuencia de M1' humano usa el sitio del aceptor de empalme M1 de ratón ubicado hacia la izquierda de 5' y luego se fusiona a la secuencia M1 de ratón hacia la derecha de 3' (Figura 14B). También se insertó un cassette IRES-EGFPpA – Neo en 3' de la secuencia M2 de ratón. Esta inserción permitirá la expresión de IgE de ratón con el dominio M1' humano en la superficie de células B de IgE+. La secuencia M1' no será expresada en el IgE secretado.

Cribado de líneas knockin de M1' (PCR)

Los ratones knockin con M1' humano fueron genotipados mediante PCR usando cebadores específicos para el locus IgE de ratón y la secuencia de M1' humano. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

WT FOR	5'-GGCCAAAGACCCTAAGACAGTC	(N° IDENTIFICADOR DE SECUENCIA: 106)
huM1' FOR	5'-GGGCTGGCTGGCGGCTCCGC	(N° IDENTIFICADOR DE SECUENCIA: 107)
WT REV	5'-CTATGCCCTGGTCTGGAAGATG	(N° IDENTIFICADOR DE SECUENCIA: 108)

Se analizó el ADN genómico purificado con los cebadores anteriores usando 32 ciclos del siguientes programa [94°C 4 min; 94°C 1 min; 60°C 30 seg; 72°C 1 min (30 ciclos); 72°C 10 min]. Entonces se hicieron correr los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% 0,5X TBE. El genotipo de PCR de tipo salvaje dio un producto de 668 bp y el knockin hu-M1' generó un producto de 457 bp (Figura 14C).

Cribado de líneas knockin de M1' (Southern)

Se cribaron las células ES de knockin huM1' y las líneas finales de ratón y se verificaron mediante Southern blot. Se digirieron 10 µg de célula ES purificada o de ADN genómico de cola con HindIII para el brazo izquierdo o BamHI para el brazo derecho durante toda la noche. A continuación se hizo correr el ADN digerido en un gel 1X TAE de agarosa al 0,8%. El ADN se transfirió entonces a una membrana de nylon (Roche #1417240) usando un tampón de desnaturalización (1,5M NaCl; 0,5M NaOH) durante toda la noche. Se enjuagó la membrana, se reticuló con UV, y luego se empapó en solución DIG Easy Hyb (Roche #1585762) durante 4 horas con rotación a 46°C. Se generaron sondas

mediante PCR usando el equipo PCR DIG probe Synthesis Kit, según las instrucciones del fabricante (Roche #11636090910).

Los cebadores para el brazo izquierdo fueron:

FOR 5'-TGTCTGGTGGTGGACCTGGAAAGCG (N° identificador de secuencia: 109)

Rev 5'-TCCTCGCTCTCCTCCTCTGGTGGTG (N° identificador de secuencia: 110)

Los cebadores para el brazo derecho fueron:

FOR 5'-CCATGCAACCTAGTATCCTATTCTC (N° identificador de secuencia: 111)

Rev 5'-CTTTATACAGGAGAACCTAGCCCAG (N° identificador de secuencia: 112)

Las sondas fueron evaluadas contra un producto PCR sin etiquetado para garantizar un mayor aumento y un buen etiquetado DIG. Las inmunotransferencias fueron sondeadas durante toda la noche con sondas hervidas a 46°C con rotación. Al día siguiente, las inmunotrasnferencias se lavaron y revelaron con anticuerpo anti-DIG, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las inmunotransferencias fueron expuestas a la película durante 15-20 minutos. En la figura 14D se ilustran los resultados del análisis Southern. Los ratones salvajes generan un fragmento de HindIII de 7,4 kB de brazo izquierdo que se convierte en un fragmento de 3kB en el alelo knockin de hu-M1'. Los ratones salvajes generan un fragmento de BamHI de 14.1 kB de brazo derecho que se convierte en un fragmento de 18,1 kB en el alelo knockin de hu-M1'. Se muestran los ratones salvajes y heterocigóticos (Figure 14D).

EJEMPLO 11

Modelo transgénico de Hu-M1': inmunización TNP-OVA

Este ejemplo ilustra la capacidad de los candidatos anti-IgE/M1' para prevenir la generación de IgE como estímulo de TNP-OVA en una respuesta primaria inmunológica (Exp. #07-0234F; figura 15A-I) o respuesta de memoria (Exp. #07-0234B; Figura 16A-K) a TNP-OVA. TNP-OVA, o trinitrofenil-ovalbumina es un inmunógeno de alta potencia que se usa a menudo para generar potentes respuestas inmunológicas a anticuerpos.

Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Los valores P fueron calculados usando software de estadística JMP. La prueba de Dunnett compara medias de grupo en que todas los grupos de prueba son evaluados respecto de un grupo de referencia. La t de Student de cada par compara cada par de grupos usando la prueba t de Student. Se aplica entonces una corrección de Bonferroni para ajustar los valores p de la t de Student de cada par para protegerse contra comparaciones de pares. El umbral de valor p es de 0,05. El cambio porcentual en los datos referidos para respuesta primaria (Figura 15 A-I) y la respuesta inmunológica de memoria (Figuras A-K) se calculó sustrayendo el valor medio del grupo no infectado o no inmunizado de cada uno de los valores de ratones, las medias de grupo fueron recalculadas y se calculó entonces el porcentaje de cambio contra el grupo de control de cada punto de tiempo.

La inmunización TNP-OVA de ratones knockin con IgE/M1' humano (C57BL/6) induce una respuesta in vivo equilibrada de Th1/Th2. Los niveles de IgE específico de antígeno tras inmunización y desafío primario alcanzan ~10-200 ng/ml. En el experimento #07-0234F, se inmunizó a ratones knockin huM1' (C57Bl/6) con TNP-OVA (Biosearch Technologies, Novato, CA) (100 µg en 2 mg de alumbre por ratón i.p.) el día 0 (Figura 15A). Se trató entonces a los ratones con 0,1 mg/kg de anticuerpos tres veces por semana entre los días 0 y 28 (Figura 15A). En el experimento #07-0234B, se inmunizó a ratones knockin huM1' (C57Bl/6) con TNP-OVA/alumbre el día 0 (como la vez anterior) y luego se hizo el desafío con TNP-OVA (100 µg por ratón i.p.) el día 28 (Figura 16A). Se trató a los ratones con 10 mg/kg de anticuerpos entre los días 28 y 49 (Figura 16A). Se extrajo sangre a los ratones durante el transcurso de la respuesta inmunológica para monitorear los niveles de IgE e IgG1 sérico específicos a antígenos.

Se midieron los niveles de IgE e IgG1 específicos a TNP-OVA usando placas de ELISA (384 pocillos con superficie MaxiSorp™, Nunc, Neptune, NJ) recubiertas durante 12-18 hr a 2 – 8°C con 25 µl/pocillo de TNP-OVA (relación de TNP:OVA de 13:1) (Biosearch Technologies, Novato, CA) diluida a 0,5 µg/mL en 50mM de carbonato/bicarbonato de sodio, pH 9,6. A continuación se decantaron las placas y se secaron con paño. Se agregó un tampón de bloqueo (PBS, BSA al 0,5%, pH 7,2, 50 µl/pocillo) a las placas durante 1 – 2 hr. Esta incubación y todas las siguientes se realizaron a temperatura ambiente con agitación suave. Las muestras se diluyeron a 1/50 en diluyente de ensayo (PBS, BSA al 0,5%, Tween-20 al 0,05%, Proclina 300 al 0,01%) seguido de diluciones a 1/3 en serie en once puntos. Los estándares fueron diluidos en serie el doble en diluyente de ensayo sobre siete puntos, comenzando en 1ng/ml para IgG1 anti-TNP OVA y 3ng/ml para IgE anti-TNP OVA. Se lavaron las placas tres veces con tampón de lavado (PBS, Tween-20 al 0,05%, pH 7,2) y se agregaron estándares, muestras y controles (25µL/pocillo) para duplicar las placas para la detección separada de isotipos de IgG1 e IgE. Tras una incubación de 1,5 – 2 hr, las placas se lavaron seis veces con tampón de lavado. Se diluyeron el IgG1 e IgE mAb antirratón de rata biotinilado (BD Biosciences, San Diego, CA) a 0,5 µg/mL para IgG1 ó 1,0 µg/mL para IgE en diluyente de ensayo y se agregaron a las placas correspondientes (25 µl/pocillo). Se incubaron las placas durante 1 – 1,5 hr y se lavaron seis veces con tampón de lavado. Se diluyó conjugado de peroxidasa de estreptavidina-rábano (AMDEX, GE Healthcare, Piscataway, NJ) a 1/80.000 para IgG1 o 1/5.000 para IgE y se agregó a las placas (25 µl/pocillo) durante 30 min. Después de lavarlas seis veces con tampón de lavado, se revelaron las placas añadiendo 25µL/pocillo de tetrametilbenzidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) e incubando durante 15 min para el IgG1 o 25 min para el IgE. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl/pocillo de 1M H_3PO_4, y la absorbancia se leyó a 450 nm con una referencia de 620 nm. Los resultados de muestras desconocidas se interpolaron de ajustes de 4 parámetros de las curvas estándares.

Las células plasmáticas de ratón de bazo o nódulos linfáticos se identificaron en primer término separando las células CD138+. Estas células plasmáticas productoras de IgE fueron cuantificadas mediante el método Elispot. En el caso de las células productoras de IgE totales, se utilizó un anticuerpo anti-IgE (de BD OptEIA mIgE set #555248) en placas MultiScreen HTS (Millpore #MSIPS4W10) con una dilución de 1:2 usando tampón de recubrimiento ELISA a 50 µl por pocillo. El recubrimiento se realizó a 4°C durante la noche. A la mañana siguiente, las placas se lavaron 5 veces con 200µl de

PBS-tween 20 estéril (0,05%) usando una pipeta de canales múltiples en la capucha de cultivo de tejido. Se bloquearon entonces las placas en 300 µl de PBS / BSA al 5% o medio de cultivo celular (RPMI-1640, FBS al 10%) durante dos horas a temperatura ambiente. Se prepararon suspensiones de células únicas del bazo o nódulo linfático y las células se contaron mediante FACS (como se indica anteriormente). Se prepararon las células para ponerlas en placas, comenzando con 10^7 células, seguidas por diluciones triples o cuádruples para modelos de inmunización TNP-OVA, o $4x10^6$ células seguidas por diluciones dobles para los modelos de infección con Nippostrongylus. La línea de células B A20 de ratón se usaron como control negativo y la línea celular TIB-141 se usó como control positivo. Se prepararon diluciones celulares en un medio de cultivo celular (RPMI-1640 + 10% FBS). Tras el paso de bloqueo, las placas se lavaron una vez con medio de cultivo celular y se aspiraron. Las células se colocaron en placas a 100µl por pocillo. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C, CO_2 al 5%. Al día siguiente, las placas se lavaron 6 veces usando un SkanWasher 300 (Molecular Devices (Sunnyvale, CA)) con PBS-tween 20 (0,05%). Se usó entonces un anticuerpo secundario biotinilado del set BD OptEIA mIgE (#555248) con la concentración indicada por el fabricante, por lo general entre 1:250 – 1:500 en 100µl/pocillo. El anticuerpo secundario se preparó en PBS / BSA al 1%. Las placas se incubaron entonces durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron 6 veces usando un SkanWasher300 con PBS-tween 20 (0,05%). Se agregó entonces AP de estreptavidina (R&D #SEL002) con una dilución de 1:60 en 100 µl por pocillo, también preparada en PBS / BSA al 1%, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron entonces como la vez anterior 3 veces y luego se enjuagaron dos veces con agua DI. Todo el líquido restante se absorbió con una toalla de papel. Se agregó entonces el hreactivo de revelado, BCIP/NBT (100 µl/pocillo), y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se decantó entonces el sustrato y las placas se enjuagaron dos veces con agua DI. Las placas fueron invertidas para eliminar el exceso de agua y se las dejó secar. Se cuantificaron las manchas usando un microscopio de disección.

En el experimento #07-0234F se evaluó la capacidad del anti-IgE/M1' para impedir una respuesta de IgE a la inmunización primaria TNP-OVA. Los ratones tratados con el control isotípico anti-gp120 generaron IgE sérico, con niveles máximos entre los días 8 a 14 (~25 ng/ml) (Figura 15B). El tratamiento con anti-IgE/M1' previno el aumento de IgE sérico para el día 8 (98%) y el día 14 (99%) (Figura 15 C-D). Esta reducción fue significativamente diferente de los animales tratados con isotipo, y no significativamente diferente de los ratones no inmunizados (Figuras 15 C-E). El anti-IgE/M1' sólo tuvo una incidencia modesta en los niveles de IgG1 específico al antígeno durante los 28 días del experimento (Figuras 15 F-I).

En el experimento #07-0234B se evaluó la capacidad del anti-IgE/M1' para impedir una respuesta de IgE secundaria/de memoria a TNP-OVA. La respuesta de IgE secundaria al aumento de TNP-OVA el día 28 es más rápida, y llega a un nivel máximo tras 4 días, en lugar de 8-9 días en la respuesta primaria (Figura 16B). El tratamiento con candidatos anti-IgE/M1', comenzando con el aumento del día 28, disminuyó el aumento de IgE entre los días 28 y 35 (Figura 16B). Los niveles de IgE tratados con anti-IgE/M1' se vieron reducidos significativamente en comparación con el control isotípico, 59-75% para el día 32 y 90-93% para el día 35 (Figuras 16C-D). Para el día 35-42 los niveles de IgE no eran significativamente diferentes de los niveles de los ratones no inmunizados (Figura 16E). El análisis del

área bajo la curva de estos grupos de tratamiento entre los días 28 y 49 ofrece otra demostración de que el anti-IgE/M1' redujo los niveles de IgE sérico en 74-84%, y que el nivel diario promedio de IgE específico al antígeno se redujo también en 74-83% (Figuras 16 F-H). No se observó ninguna reducción significativa de IgG1 específico al antígeno tras el tratamiento con anti-IgE/M1' (Figuras 16 I-K).

EJEMPLO 12

Modelo transgénico de Hu-M1': Modelo de infección con *Nippostrongylus brasiliensis*

En este ejemplo se ilustra la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' para prevenir la producción de IgE (Figuras 17A-D), además de para reducir terapéuticamente la producción de IgE en una infección por *Nippostrongylus brasiliensis* inducida previamente. La reducción de la producción de IgE se evaluó mediante la administración de anticuerpos anti-IgE/M1' con niveles máximos de IgE de la respuesta inmunológica (Figuras 18 A-I), y al aplicarse tardíamente en la respuesta inmunológica (Figuras 19 A-G).

El *Nippostrongylus brasiliensis* es un nematodo gastrointestinal que infecta a ratas y ratones. Los huevos son incubados en heces y maduran hasta larvas L3 de etapa infecciosa. Las larvas L3 ingresan al huésped a través de la piel y migran a los vasos sanguíneos, desde donde se trasladan a los pulmones al cabo de uno o dos días. Luego de convertirse en larvas de etapa L4 en los pulmones, se trasladan por la tráquea y el esófago del huésped y llegan al yeyuno el día 2 ó 3. Las larvas maduran, se convierten en gusanos adultos, se aparean y producen huevos el día 5. Los huevos de *N. brasiliensis* se excretan en las heces de los huéspedes.

Los ratones infectados con *N. brasiliensis* demuestran inicialmente una respuesta inmunológica innata, seguida de una fuerte inmunidad de tipo 2 para eliminar la infección. En la primera etapa de la infección se observa depósito de complemento y fibronectina para facilitar el reclutamiento y la adherencia de leucocitos. Se envían hacia el pulmón células efectoras, como eosinófilos, basófilos, y células CD4+ Th2 para combatir la infección. Las citoquinas Th2, además de IL-4 y IL-13, cumplen una función esencial en mantener la respuesta inmunológica de los pulmones, y se les necesita para eliminar gusanos del intestino. Las respuestas de tipo 2 se caracterizan por altos niveles de producción de anticuerpos, incluido el IgE.

Los ratones knockin con IgE/M1' humano (C57BL/6) generan una fuerte respuesta de IgE ante infección por *N. brasiliensis*, con un nivel máximo entre los días 15-20 (Figuras 17B, 18B, 19B). Los niveles de IgE sérico descienden entonces a un nivel menor, pero que se mantiene elevado. Se infectó a ratones con Nippostrongylus brasiliensis el día 0. Los tres experimentos de infección por *N. brasiliensis* se trataron con 10 mg/kg de anticuerpos anti-IgE/M1' mIgG1 o control isotópico anti-gp120 mIgG1. En el estudio preventivo (Figura 17A), los ratones knockin huM1' fueron tratados tres veces por semana desde el día 0 hasta el día 21. En el estudio de producción máxima (Figura 18A), los ratones knockin huM1' fueron tratados tres veces por semana entre los días 11 y 21. En el estudio de intervención tardía (Figura 19A), los ratones knockin huM1' fueron tratados tres veces por semana entre los días 41 y 62.

Los datos se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Los valores P fueron calculados usando software de estadística JMP. La prueba de Dunnett compara medias de grupo en que todas los grupos de prueba son evaluados respecto de un grupo de referencia. La t de Student de cada par

compara cada par de grupos usando la prueba t de Student. Se aplica entonces una corrección de Bonferroni para ajustar los valores p de la t de Student de cada par para protegerse contra comparaciones de pares. El umbral de valor p es de 0,05. El cambio porcentual en los datos referidos en los estudios preventivo y de producción máxima se calculó sustrayendo el valor medio del grupo no infectado o no inmunizado de cada uno de los valores de ratones, las medias de grupo fueron recalculadas y se calculó entonces el porcentaje de cambio contra el grupo de control de cada punto de tiempo. En el estudio de intervención tardía, el cambio porcentual se calculó dentro de cada grupo de tratamiento comparando los días 48 y 55 al día 41.

Las células plasmáticas productoras de IgE se definieron y evaluaron mediante Elispot, como se describiera anteriormente en el ejemplo 12.

El estudio preventivo evaluó la capacidad del anti-IgE/M1' para prevenir el aumento en IgE en respuesta a una infección primaria por *Nippostrongylus*. Los ratones de control (tratados con isotipo) alcanzaron altos niveles de producción de IgE para el día 15 tras la infección (~3000 ng/ml). Los ratones tratados con anti-IgE/M1' habían reducido la producción de IgE tras la infección (reducción de 93-94% en comparación con anti-gp120 mIgG1), lo cual no fue significativamente diferente respecto de ratones no infectados (Figuras 17 B-D).

El estudio de producción máxima evaluó la capacidad de anti-IgE/M1' de reducir niveles de IgE en forma terapéutica en el punto máximo de la respuesta de IgE a la infección por *N. brasiliensis*. Todos los grupos de tratamiento alcanzaron niveles de IgE altos (~2000 ng/ml) para el día 11 tras la infección por *Nippostrongylus* (Figura 18B). El tratamiento con anti-IgE/M1' comenzó el día 11 en el punto máximo de esta respuesta. Los candidatos anti-IgE/M1' mIgG1 redujeron los niveles de IgE sérico en 82-89% dentro de cuatro días de iniciado el tratamiento (Figura 18 C-D). Para el día 21 los niveles de IgE en ratones tratados con anti-IgE/M1' se redujeron en 97- 98%, llegando a niveles que no son estadísticamente diferentes del grupo de control no infectado (Figura 18E). Se cuantificaron las células plasmáticas productoras de IgE mediante Elispot de anti-IgE. La infección por *N. brasiliensis* indujo a una cantidad significativa de células productoras de IgE en el nódulo linfático mesentérico (~30 células por $4x10^6$; Figura 18F) y el bazo (~10 células por $4x10^6$; Figura 18G). Para el día 21 el tratamiento con anti-IgE/M1' redujo las células productoras de IgE en el nódulo linfático mesentérico en 88-94% y en el bazo en 57-66%. La frecuencia de las células plasmáticas totales (CD138+ células) en el nódulo linfático mesentérico y en el bazo aumentó en todos los grupos de tratamiento en comparación con los ratones no infectados, y no hubo ningún cambio significativo en la frecuencia de células plasmáticas totales en ningún órgano debido al tratamiento con anti-IgE/M1' (Figura 18 H-I). Estos resultados demuestran la capacidad de los anticuerpos anti-IgE/M1' de reducir el IgE sérico a niveles nominales eliminando células productoras de IgE in vivo, aun cuando se aplican en el nivel máximo de producción de IgE.

El estudio de intervención tardía evaluó la capacidad del anti-IgE/M1' para reducir el IgE de nivel bajo sostenido que se logra tardíamente en el ciclo de infección. Todos los grupos de tratamiento lograron el nivel máximo de producción de IgE cerca del día 15. Tras el inicio del tratamiento anti-IgE/M1' el día 41, hubo algunas diferencias en los niveles de IgE sérico entre grupos de tratamiento (Figuras 19 B-C), lo que se normalizó haciendo referencia a los niveles del día 41 como 100% (Figura 19D). El tratamiento con anti-IgE/M1' redujo significativamente los niveles de IgE sérico en

comparación con el control isotípico anti-gp120 mIgG1 entre los días 48 y 55 (Figuras 19 E-G). Para el día 48 y 55 los niveles IgE se redujeron 64-75% y 75-84%, respectivamente, en comparación con el control isotípico (anti-gp120 mIgGI) que disminuyó 20% y 37%, respectivamente (Figuras 19 F-G). La diferencia en niveles de IgE medios entre los grupos de tratamiento no fue significativamente diferente del grupo de control isotípico (gp120) antes de comenzar la terapia con anti-IgE/M1' (Figura 19E). No obstante, el tratamiento con anticuerpos anti-IgE/M1' demostró una disminución más ostensible y significativa de los niveles IgE sérico que la observada en el grupo de control para el día 48 (Figura 19F) y día 55 (Figura 19G). Se calculó el cambio porcentual y el valor p (d41) comparando los días 48 ó 55 de cada grupo de tratamiento con el valor de inicio del mismo grupo el día 41 antes del tratamiento.

EJEMPLO 13

Expresión de anticuerpo anti-IgE/M1' en células de mamíferos

En este ejemplo se ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de la proteína o anticuerpo deseado mediante expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase la Patente Europea 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Optativamente, el ADN que codifica la cadena ligera y/o pesada del anticuerpo anti-IgE/M1' se liga a pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la insercón de dicho ADN usando métodos de ligado como los descritos en Sambrook *y col.*, *citado anteriormente*.

En una forma de realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293 humanas (ATCC CCL 1573) para confluir en placas de cultivo tisular en medio de cultivo como DMEM enriquecido con suero fetal de ternero y, opcionalmente, nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan alrededor de 10 µg de ADN codificante del anticuerpo anti-IgE/M1' ligado a pRK5 con alrededor de 1 µg de ADN codificante del gen de ARN VA [Thimmappaya *y col.*, *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 0,227 M $CaCl_2$. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$ y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante unas cuatro horas a 37 °C. Se aspira el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, se lavan las células 293 con medio de cultivo libre de suero, se añade nuevo medio de cultivo y las células se incuban durante unos 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se extrae el medio de cultivo y se sustituye por un medio de cultivo sólo o uno que contenga 200 µCi/ml de ^{35}S-cisteína y 200 µCi/ml de ^{35}S-metionina. Después de 12 horas de incubación, el medio de cultivo condicionado se recoge, se concentra en un filtro rotatorio y se carga en un gel con SDS al 15%. El gel procesado se puede secar y exponer para que se forme una película durante un periodo de tiempo seleccionado y revele la presencia del anticuerpo de anti-IgE/M1'. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a nueva incubación (en medio de cultivo libre de suero) y el medio de cultivo se analiza mediante bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el anticuerpo anti-IgE/M1'puede introducirse en células 293 utilizando de forma transitoria el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac y col, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981). Se cultivan células 293 hasta lograr una densidad máxima en un matraz giratorio y se agregan 700 μg de ADN codificante del anticuerpo anti-IgE/M1' ligado a pRK5. Las células se concentran primero desde el matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN y dextrano se incuba en el pellet de células durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con un medio de cultivo tisular y se introducen de nuevo en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo tisular, 5 μg/ml de insulina bovina y 0,1 μg/ml de transferrina bovina. Después de unos 4 días, los medios de cultivo condicionados se centrifugan y filtran para extraer células y desechos. La muestra que contiene el anticuerpo anti-IgE/M1' expresado se puede entonces concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el anticuerpo anti-IgE/M1' puede expresarse en células CHO. El ADN codificante del anticuerpo anti-IgE/M1' ligado a pRK5 puede transfectarse a células CHO usando reactivos conocidos, como $CaPO_4$ o DEAE-dextran. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar y el medio de cultivo se puede sustituir por medio de cultivo (solo) o por un medio de cultivo que contenga un radiomarcador como ^{35}S-metionina. Tras determinar la presencia del polipéptido del anticuerpo anti-IgE/M1', el medio de cultivo puede ser sustituido por medio de cultivo sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante unos 6 días y, luego, se recoge el medio condicionado. El medio de cultivo que contiene el anticuerpo anti-IgE/M1' expresado se puede entonces concentrar y purificar utilizando cualquier método seleccionado.

Las variantes rotuladas como epítopo del anticuerpo anti-IgE/M1' pueden también expresarse en células CHO. El ADN codificante del anticuerpo anti-IgE/M1' ligado a pRK5 puede subclonarse a partir del vector pRK5. La inserción del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en la estructura con un marcador del epítopo seleccionado, como el marcador poli-his y obtener un vector de expresión Baculovirus. La inserción del ADN marcado con poli-his que codifica el anticuerpo anti-IgE/M1' se puede subclonar entonces en un vector dirigido por SV40 que contenga un marcador de selección como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO se pueden transfectar (como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. Se puede llevar a cabo la marcación, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contenga el anticuerpo anti-IgE/M1' marcado con poli-His expresado se puede entonces concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, como cromatografía de afinidad con quelante Ni^{2+}.

El anticuerpo anti-IgE/M1' también se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el procedimiento que se indica a continuación. Las proteínas se expresan como un constructo de IgG (inmunoadhesina), en el que las secuencias codificantes correspondientes a las formas solubles (por ejemplo, los dominios

extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de la región constante de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o una forma marcada con poli-His.

Tras amplificación mediante PCR, los ADN respectivos son subclonados en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar como se describe en Ausubel y col., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés, con el fin de permitir la entrada y salida cómoda de los ADNc. La expresión usada por el vector en células CHO es la descrita en Lucas y col., *Nucl. Acids Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor temprano/potenciador de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y de la hidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección de un mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introducen 12 microgramos del ADN del plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reagentes para transfección comercializados como SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas y col., citado anteriormente. Se congelan aproximadamente 3 x 10^{-7} células en una ampolla para su posterior cultivo y producción tal como se describe a continuación.

Se descongelan las ampollas que contienen el ADN del plásmido mediante colocación en un baño de agua y se mezclan mediante centrifugación. El contenido se pipetea en un tubo de centrifugado que contiene 10 ml de medio de cultivo y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El supernatante se aspira, y las células se suspenden de nuevo en 10 ml de medio selectivo (0,2 µm de PS20 filtrado con 0,2 µm de suero fetal bovino diafiltrado al 5%). Luego, las células se separan en partes alicuotas en un matraz rotatorio de 100 ml que contenga 90 ml de medio selectivo. Tras 1-2 días, las células se transfieren a un matraz rotatorio de 250 ml llenado con 150 ml de medio de cultivo selectivo e incubado a 37°C. Al cabo de otros 2-3 días, se siembran 3 x 10^5 células/ml en matraces rotatorios de 250 ml, 500 ml y 2000 ml. El medio de cultivo se cambia por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio CHO apropiado, se puede utilizar en realidad un medio de producción descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.122.469, publicado el 16 de junio de 1992. Se siembra un matraz rotatorio de 3 L de producción con 1,2 x 10^6 células/ml. El día 0, se determina la cantidad y el pH de las células. El día 1, se toman muestras del matraz rotatorio y se inicia la extracción con aire filtrado. El día 2, se toman muestras del matraz, se modifica la temperatura a 33 °C y se toman 30 ml de 500 gr/l de glucosa y 0,6 ml de antiespuma al 10% (por ejemplo, 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, emusión homologada para uso médico Dow Corning 365). Durante todo el proceso de producción, se va ajustando el pH según sea necesario para mantenerlo en torno a 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad caiga por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 µm. El producto resultante de la filtración se almacena a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para su purificación.

Para los constructos marcados con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol a los medios condicionados con una concentración de 5 nM. Los medios condicionados se bombean hacia una columna Ni-NTA de 6 ml

equilibrada a 4°C, en tampón de 20 mM Hepes, pH 7,4, que contiene 0,3 M NaCl y 5 mM imidazol con una tasa de flujo de 4-5 ml/min. Tras la carga, la columna se lava con el tampón de equilibrio adicional y la proteína eluida con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desaliniza entonces en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM de Hepes, 0,14 M NaCl y 4% de mannitol, pH 6,8, con una columna de 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) y se almacena a -80 °C.

Los constructos de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican del medio condicionado como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna con 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que ha sido equilibrada en 20 mM de tampón fosfato Na, pH 6,8. Tras la carga, se lava intensamente la columna con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de un tampón de 1 M de Tris, pH 9. La proteína altamente purificada se desaliniza a continuación en un tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas señalizadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida en SDS y mediante secuenciación de aminoácidos en el extremo N-terminal por degradación de Edman.

****

Depósito de materiales

Los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Collection (Colección Estadounidense de Cultivos Tipo), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	N° de depósito en la ATCC	Fecha de depósito
7A6.18	PTA-8268	21 de marzo de 2007
1C11.10.20	PTA-8267	21 de marzo de 2007
47G4.6.2	PTA-8266	21 de marzo de 2007
47H4.12.10	PTA-8270	21 de marzo de 2007
42H4.6.9	PTA-8260	21 de marzo de 2007
42A5.20.11	PTA-8265	21 de marzo de 2007
26A11.6.5	PTA-8262	21 de marzo de 2007
51D2.22.15	PTA-8264	21 de marzo de 2007
45C1.6.14	PTA-8269	21 de marzo de 2007
26B11.3.12	PTA-8261	21 de marzo de 2007
28E9.12.9	PTA-8263	21 de marzo de 2007

Estos depósitos se realizaron de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y el Reglamento del mismo (Tratado de Budapest). Éste garantiza el mantenimiento de un cultivo viable de los depósitos durante treinta (30) años a partir de la fecha de

los depósitos, y al menos cinco (5) años después de la solicitud más reciente de una muestra. ATCC hará que los depósitos estén disponibles de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest y con sujeción a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad pública permanente e ilimitada de la progenie del cultivo del depósito mediante la emisión de la correspondiente patente de EE.UU. o poniendo a disposición pública cualquier solicitud de patente de EE.UU. o de un país extranjero, lo que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la progenie según lo determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas de EE.UU. para ser facultado a ello de acuerdo con las consiguientes normas 35 USC § 122 y del Comisionado (incluida la 37 CFR § 1.14 con referencia específica a la 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que en caso de que el cultivo de los materiales en depósito muera o se pierda o destruya mientras se lo cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán de inmediato por otros iguales una vez que se lo notifique al respecto. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una autorización para poner en práctica la invención en contravención de los derechos garantizados por la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes sobre patentes.

Se considera que lo expuesto hasta el momento en la presente memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en este sector aplique la invención. El alcance de la presente invención no se ve limitado por los ejemplos presentados en la presente memoria descriptiva. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en esta memoria, serán evidentes para los expertos en el sector a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones incluidas más adelante.

LO QUE SE REIVINDICA ES:

1. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE y que induce la apoptosis en células B que expresan IgE.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en que el anticuerpo se una a IgE que es de origen humano, de mono rhesus y de mono cynomolgus.

3. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE y elimina específicamente las células B productoras de IgE cuando se administra *in vivo* una cantidad terapéuticamente efectiva a un mamífero.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, que reduce el IgE sérico total.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4, que reduce el IgE sérico libre.

6. El anticuerpo de la reivindicación 4, en que el IgE es específico al alergeno.

7. El anticuerpo de la reivindicación 3 que es quimérico.

8. El anticuerpo de la reivindicación 3 que es humanizado.

9. El anticuerpo de la reivindicación 3 que es humano.

10. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que se una específicamente al mismo epítopo al que se une un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende: 47H4, 7A6, 26A11, 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6.

11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en que el epítopo corresponde a un péptido que se selecciona del grupo que comprende: péptido 4 (Núm. ident. secuencia:8), péptido 5 (Núm. ident. secuencia:9), péptido 7 (Núm. ident. secuencia:11) o péptido 8 (Núm. ident. secuencia:12).

12. El anticuerpo de la reivindicación 11, en que el epítopo corresponde al péptido 4 (Núm. ident. secuencia:8).

13. Un péptido seleccionado del grupo que comprende: péptido 4 (Núm. ident. secuencia:8), péptido 5 (Núm. ident. secuencia:9), péptido 7 (Núm. ident. secuencia:11) o péptido 8 (Núm. ident. secuencia:12).

14. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente a un segmento de IgE de M1' con una afinidad de unión Scatchard que es equivalente a la del anticuerpo anti-IgE/M1' 47H4 de murino.

15. El anticuerpo de la reivindicación 14, en que la afinidad es de entre 0,30 y 0,83 nm.

16. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente a un segmento de IgE de M1' con una afinidad de unión Scatchard que es equivalente a la del anticuerpo anti-IgE/M1' 47H4v5 humanizado.

17. El anticuerpo de la reivindicación 16, en que la afinidad es de alrededor de 1,5 nm.

18. Un anticuerpo anti-IgE/M1' que comprende las HVR de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo o de un fragmento que se une con un antígeno del mismo, que se seleccionan del grupo que comprende : 26A11, 26A11 v.1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

19. El anticuerpo de la reivindicación 18, que comprende regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo o de un fragmento que se une a antígenos del mismo, que se seleccionan del grupo que comprende: 26A11, 26A11 v.1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

20. El anticuerpo de la reivindicación 18, que comprende las HVR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo o de un fragmento de unión a antígeno de éste de 47H4v1-6.

21. El anticuerpo de la reivindicación 18 que es afucosilado.

22. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 con al menos un vehículo farmacológicamente aceptable.

23. Una composición que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 en combinación con al menos un vehículo farmacológicamente aceptable y uno o más fármacos seleccionados del grupo que comprende: anticuerpo anti-IgE, antihistamina, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une a un marcador de superficie de células B y antagonista de BAFF.

24. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o un fragmento que se une a antígenos de éste, que comprende las HVR de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-IgE/M1' apoptótico o fragmento de unión a antígenos de éste, que se seleccionan del grupo que comprende: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

25. El ácido nucleico de la reivindicación 24, que comprende además un ácido nucleico que codifica las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la secuencia de anticuerpos, que se seleccionan del grupo que comprende: 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

26. El ácido nucleico de la reivindicación 25, en que el anticuerpo codificado es is afucosilado.

27. Un vector en el que el ácido nucleico de la reivindicación 25 está ligado en forma operacional.

28. Una célula anfitriona que incluya el vector de la reivindicación 27.

29. La célula anfitriona de la reivindicación 28 que es de un mamífero.

30. La célula anfitriona de la reivindicación 29 que es de ovario de hámster chino.

31. Un proceso para producir un anticuerpo anti-IgE/M1' apoptótico o fragmento funcional que consista en cultivar la célula anfitriona de la reivindicación 28 en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo o fragmento y para recuperar el anticuerpo o fragmento.

32. Un artículo de fabricación que contenga la composición de la reivindicación 22 y un inserto en el empaque que indique el uso para el tratamiento de un trastorno mediado por IgE.

33. El artículo de la reivindicación 32, que es un vial.

34. El artículo de la reivindicación 32, que es una jeringa prellenada.

35. El artículo de la reivindicación 34, que consta además de un dispositivo de inyección.

36. El artículo de la reivindicación 35, que es un autoinyector.

37. Un método para eliminar específicamente células B productoras de IgE, que consiste en administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente al segmento M1' del IgE e induce la apoptosis en células B que expresan IgE.

38. El método de la reivindicación 37, en que el anticuerpo consiste en las HVR de cadena pesada y ligera del anticuerpo seleccionado del grupo que comprende: 26A11, 26A11 v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

39. El método de la reivindicación 38, que comprende también la reducción del IgE sérico total.

40. El método de la reivindicación 39, que comprende también la reducción del IgE sérico libre.

41. El método de la reivindicación 39, en que el IgE es específico al alergeno.

42. El método de la reivindicación 38, en que el anticuerpo presenta actividad de ADCC.

43. Un método para tratar un trastorno mediado por IgE que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE /M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis de las células B que expresan IgE.

44. El método de la reivindicación 43, en que el anticuerpo elimina específicamente las células B que expresan IgE.

45. El método de la reivindicación 43, en que el anticuerpo reduce el IgE sérico total.

46. El método de la reivindicación 45, en que el anticuerpo reduce el IgE sérico libre.

47. El método de la reivindicación 45, en que el IgE es específico al alergeno.

48. El método de la reivindicación 43, en que el anticuerpo comprende las HVR de cadenas pesada y ligera o un anticuerpo seleccionado del grupo que comprende 26A11, 26A11v1-16, 7A6, 7A6v1, 47H4, 47H4v1-6.

49. El método de la reivindicación 43, en que el trastorno mediado por IgE se selecciona del grupo que comprende: rinitis alérgica, asma alérgica, asma no alérgica, dermatitis atópica, gastroenteropatía alérgica, anafilaxis, urticaria, alergias a alimentos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedades parasíticas, cistitis interesticial, síndrome de híper-IgE, ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, linfoplasia atímica, mieloma de IgE, reacción de injerto versus anfitrión y púrpura alérgica.

50. Un método para tratar un trastorno mediado por IgE que comprenda una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE y que induce la apoptosis de células B que expresan IgE en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un fármaco seleccionado del grupo que comprende: anticuerpo anti-IgE, antihistamina, broncodilatador, glucocorticoide, AINE, descongestionante, antitusivo,

analgésico, antagonista de TNF, antagonista de integrina, agente inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, DMARD, anticuerpo que se une a un marcador de superficie de células B y antagonista de BAFF. En un aspecto específico, el anticuerpo elimina específicamente las células B productoras de IgE.

51. Un método para tratar un trastorno mediado por IgE que comprenda un régimen de tratamiento combinado de administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE/M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE y que induce apoptosis de células B que expresan IgE antes, durante o después de la administración de un método conocido de tratamiento para trastornos alérgicos.

52. El método de la reivindicación 51, en que el tratamiento conocido para trastorno alérgico comprende la administración de un anticuerpo anti-IgE, antihistamina, broncodilatador, glucocorticoide, fármaco antiinflamatorio no esteróideo, inmunosupresor, antagonista de IL-4, antagonista de IL-13, antagonista doble de IL-4/IL-13, descongestionante, antitusivo o analgésico.

53. El método de la reivindicación 51, en que el tratamiento conocido para trastornos alérgicos comprende un régimen de tratamiento de desensibilización a alergenos.

54. Un método para prevenir la producción de IgE inducida por alergenos, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE /M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis de las células B que expresan IgE.

55. Un método para reducir la producción de IgE inducida por alergenos, que consiste en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-IgE /M1' que se une específicamente al segmento M1' de IgE e induce la apoptosis de las células B que expresan IgE.

56. Un hibridoma murino depositado en la ATCC el 21 de marzo de 2007, seleccionado del grupo que comprende: PTA-8260, PTA-8261, PTA-8262, PTA-8263, PTA-8264, PTA-8265, PTA-8266, PTA-8267, PTA-8268, PTA-8269, PTA-8270.

57. Un anticuerpo que es secretado por el hibridoma de la reivindicación 52.

58. Un animal transgénico que expresa el segmento de M1' humano de IgE.

ANTICUERPOS ANTI-IGE APOPTÓTICOS

Resumen de la divulgación

La presente solicitud guarda relación con anticuerpos anti-IgE apoptóticos, con el ácido nucleico que los codifica, con composiciones terapéuticas de éstos y con su uso en el tratamiento de trastornos mediados por IgE.

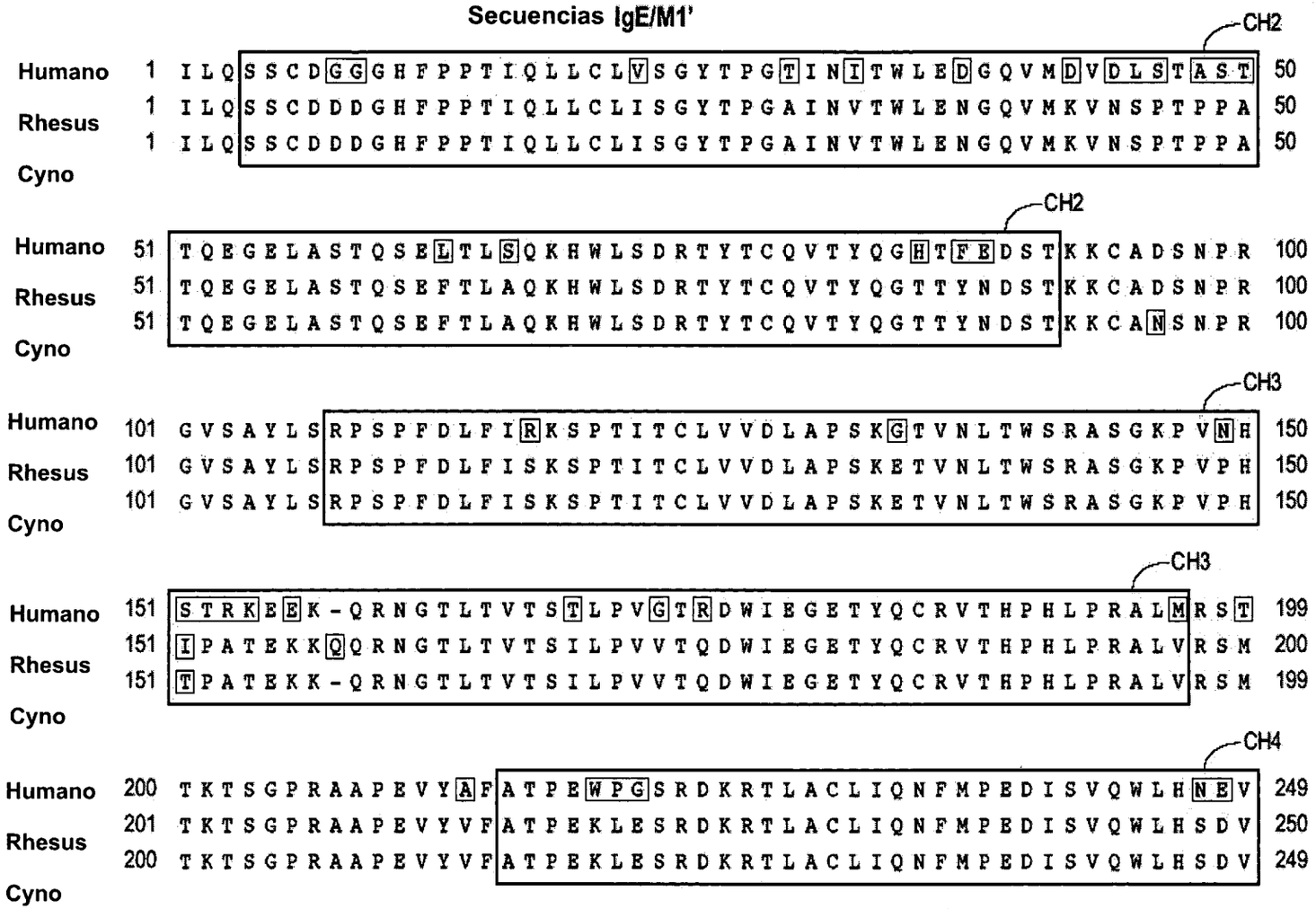

Secuencias IgE/M1'
CH2
CH2
CH3
CH3
CH4
Humano
Rhesus
Cyno
1 ILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDGQVMDVDLSTAST 50
1 ILQSSCDDDGHFPPTIQLLCLISGYTPGAINVTWLENGQVMKVNSPTPPA 50
1 ILQSSCDDDGHFPPTIQLLCLISGYTPGAINVTWLENGQVMKVNSPTPPA 50
51 TQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQVTYQGHTFEDSTKKCADSNPR 100
51 TQEGELASTQSEFTLAQKHWLSDRTYTCQVTYQGTTYNDSTKKCADSNPR 100
51 TQEGELASTQSEFTLAQKHWLSDRTYTCQVTYQGTTYNDSTKKCANSNPR 100
101 GVSAYLSRPSPFDLFIRKSPTITCLVVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNH 150
101 GVSAYLSRPSPFDLFISKSPTITCLVVDLAPSKETVNLTWSRASGKPVPH 150
101 GVSAYLSRPSPFDLFISKSPTITCLVVDLAPSKETVNLTWSRASGKPVPH 150
151 STRKEEK-QRNGTLTVTSTLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRST 199
151 IPATEKKQQRNGTLTVTSILPVVTQDWIEGETYQCRVTHPHLPRALVRSM 200
151 TPATEKK-QRNGTLTVTSILPVVTQDWIEGETYQCRVTHPHLPRALVRSM 199
200 TKTSGPRAAPEVYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEV 249
201 TKTSGPRAAPEVYVFATPEKLESRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHSDV 250
200 TKTSGPRAAPEVYVFATPEKLESRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHSDV 249

FIG. 1A

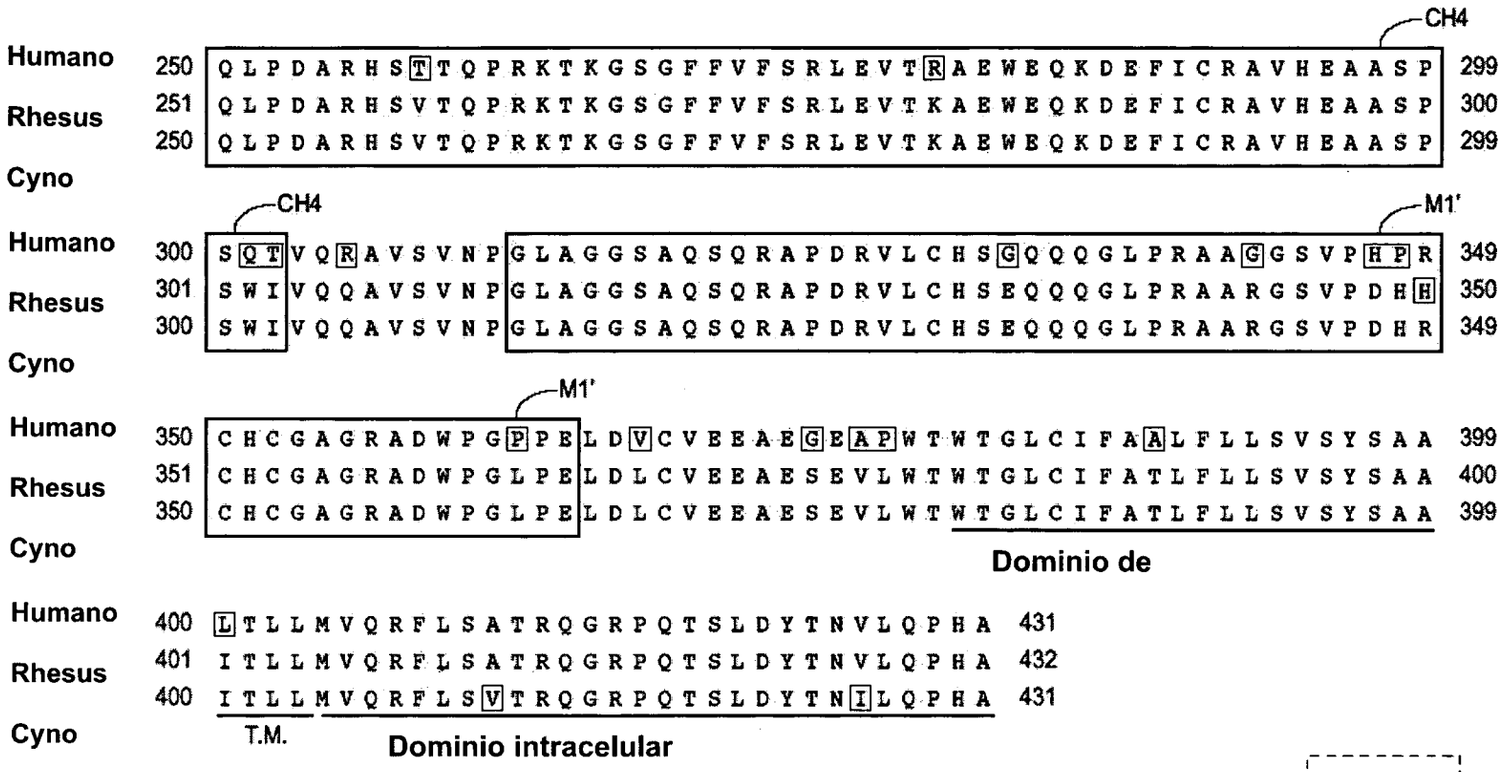


FIG. 1B

FIG. 1 *FIG. 1A*

FIG. 2A-1	FIG. 2A-2	FIG. 2A-3	FIG. 2A-4	FIG. 2A-5	FIG. 2A-6
FIG. 2B-1	FIG. 2B-2	FIG. 2B-3	FIG. 2B-4	FIG. 2B-5	FIG. 2B-6
FIG. 2C-1	FIG. 2C-2	FIG. 2C-3	FIG. 2C-4	FIG. 2C-5	FIG. 2C-6

FIG. 2

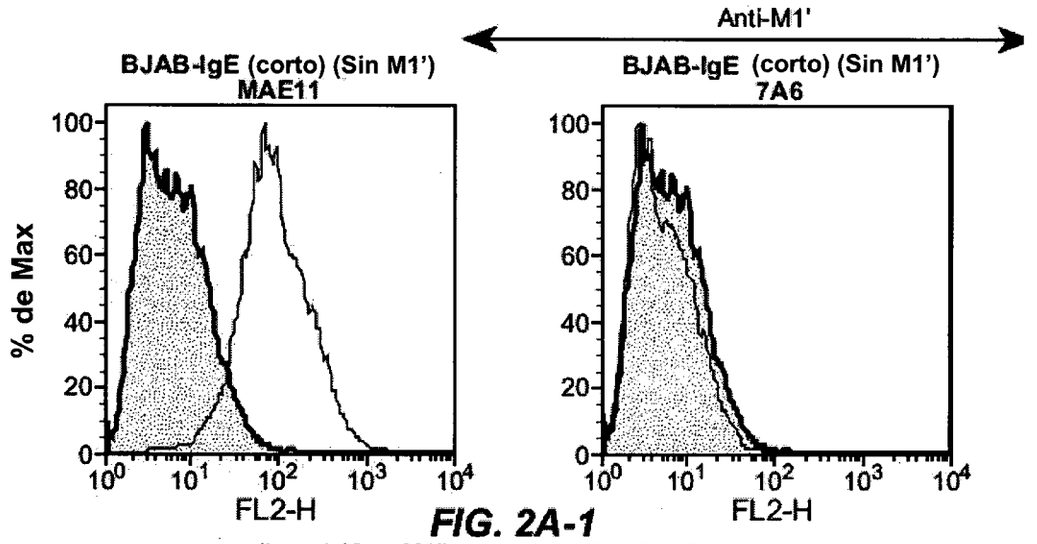


FIG. 2A-1

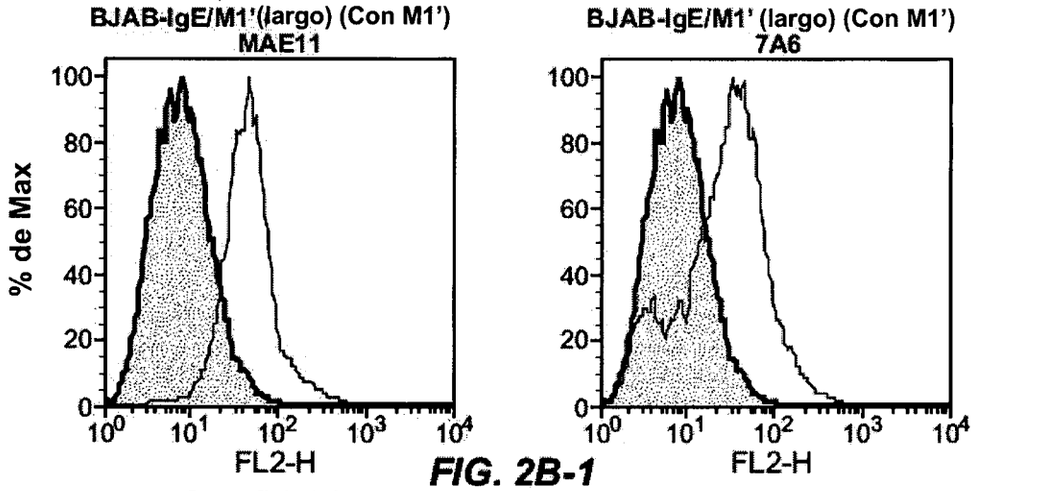


FIG. 2B-1

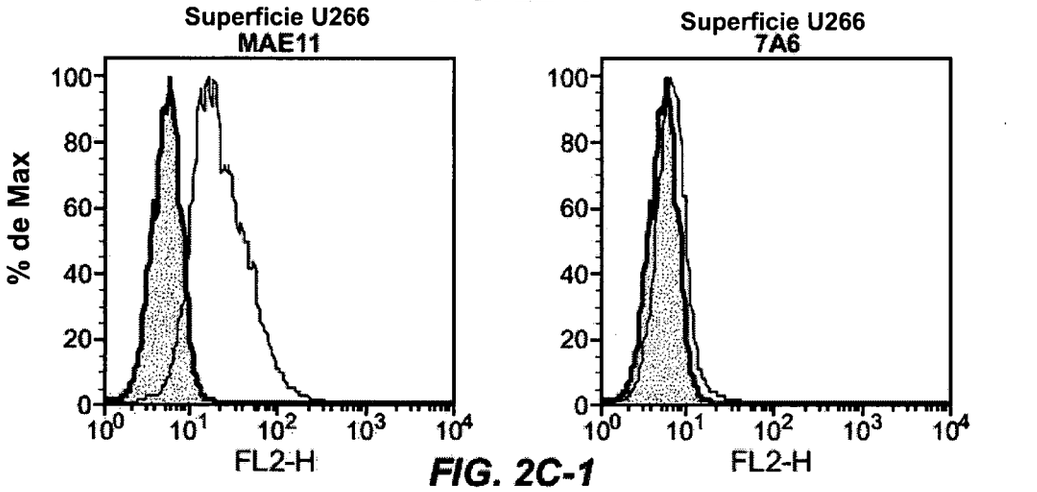


FIG. 2C-1

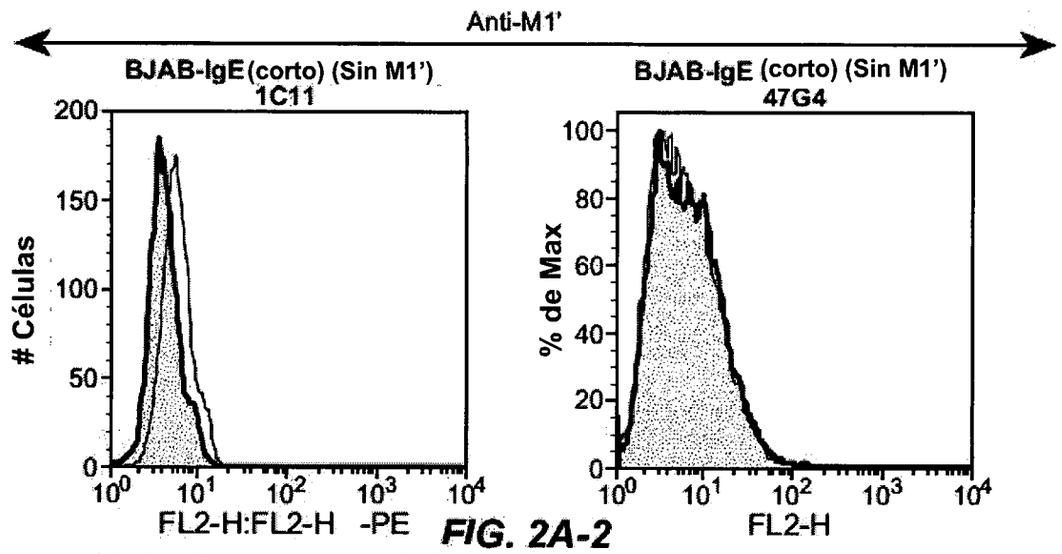


FIG. 2A-2

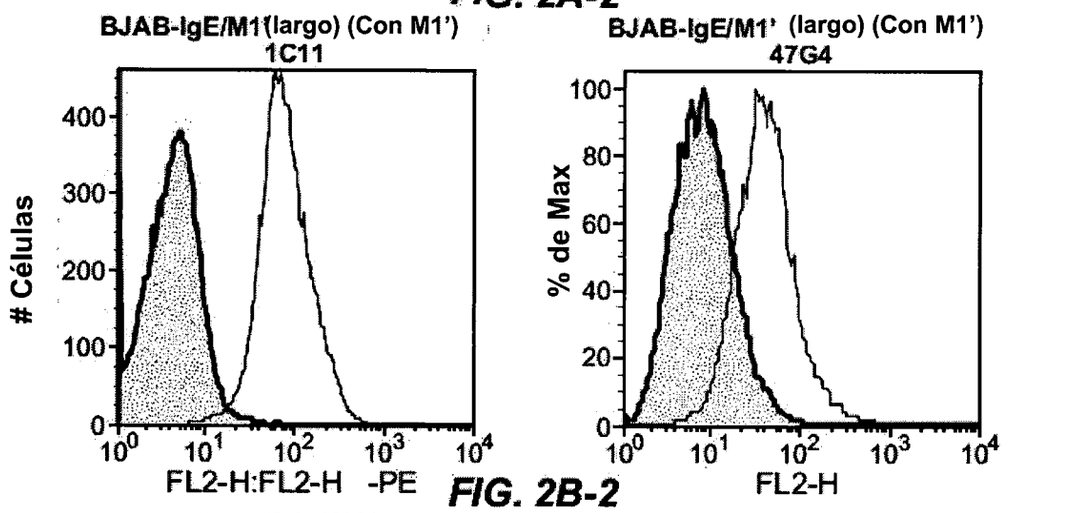


FIG. 2B-2

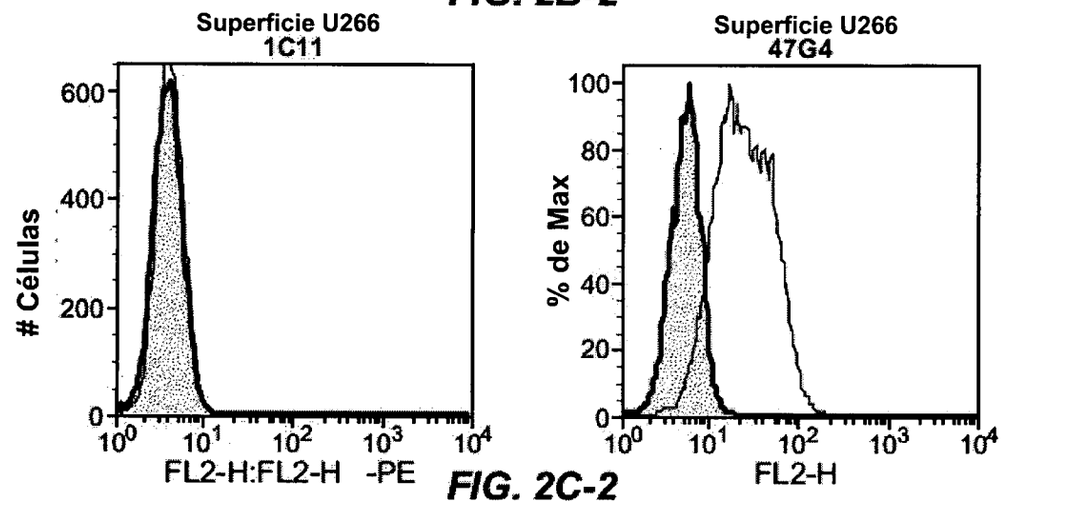


FIG. 2C-2

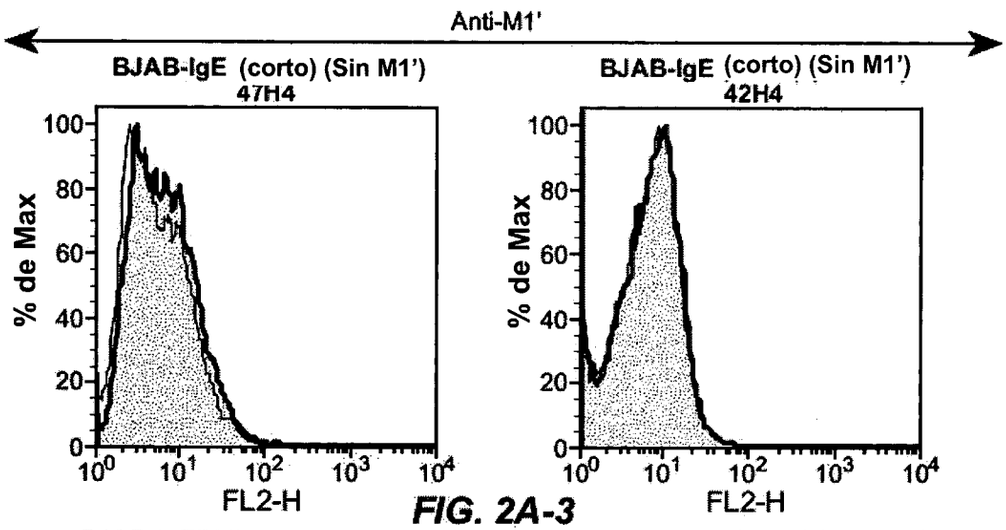


FIG. 2A-3

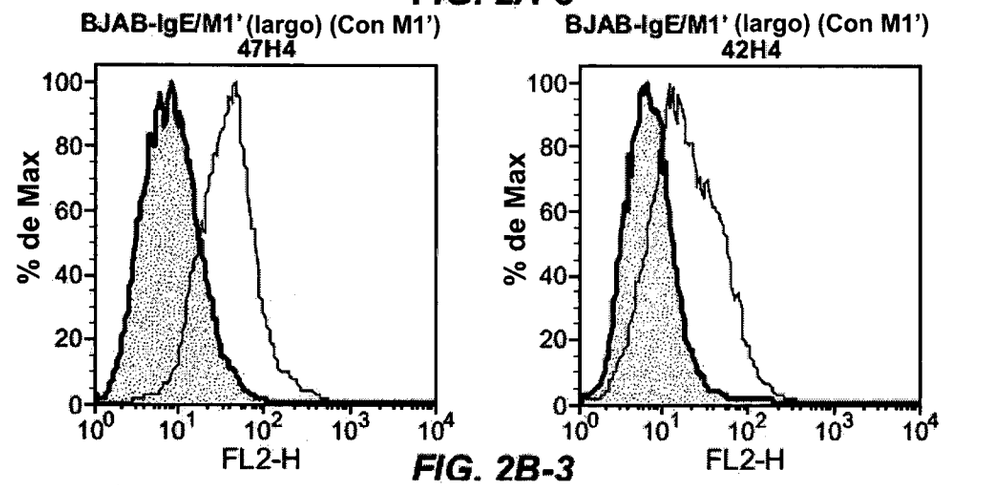


FIG. 2B-3

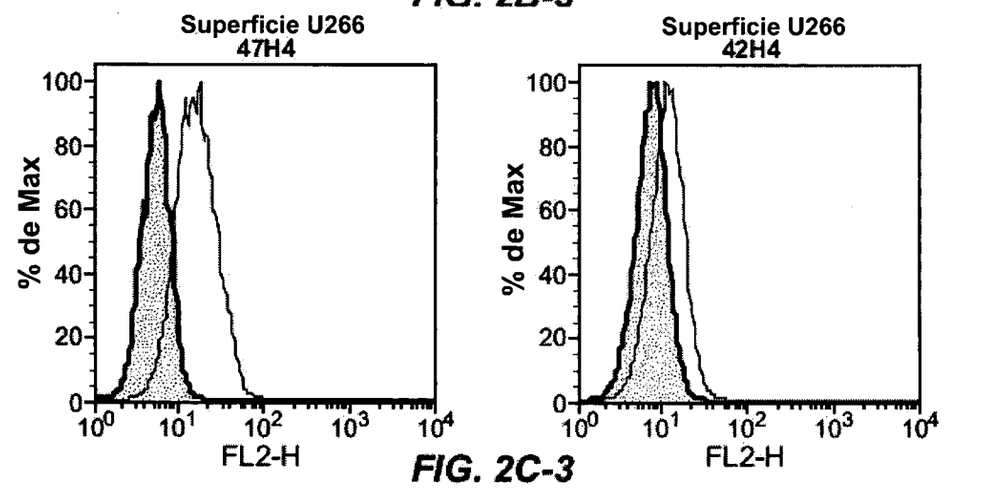


FIG. 2C-3

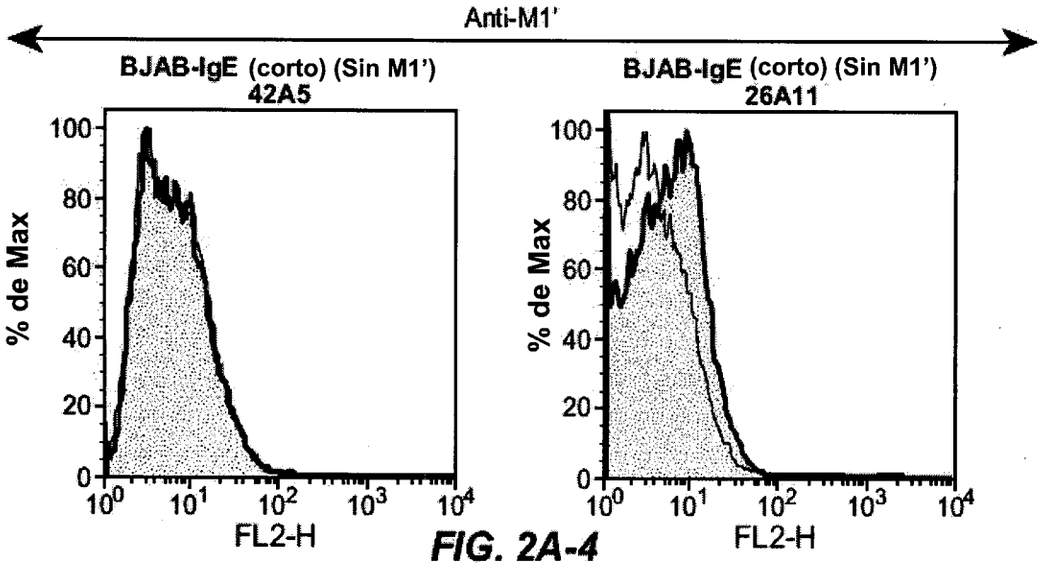


FIG. 2A-4

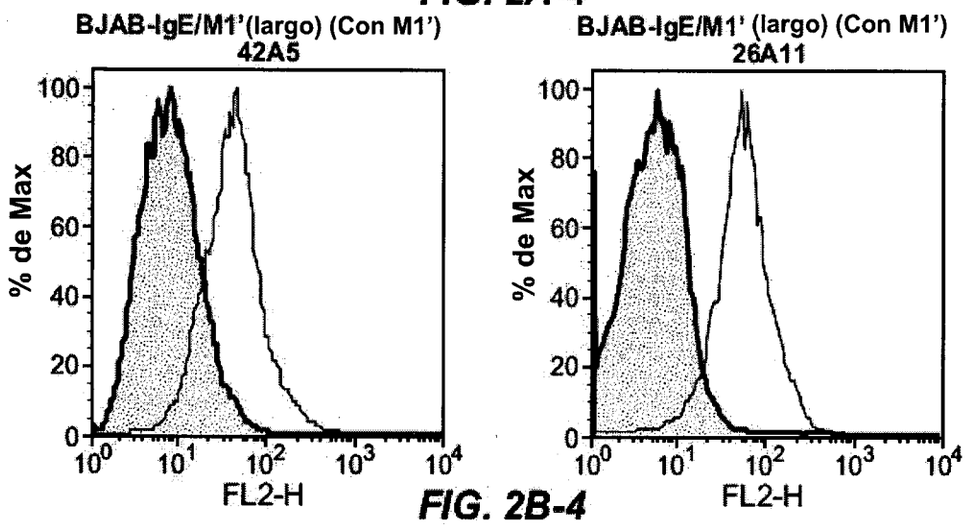


FIG. 2B-4

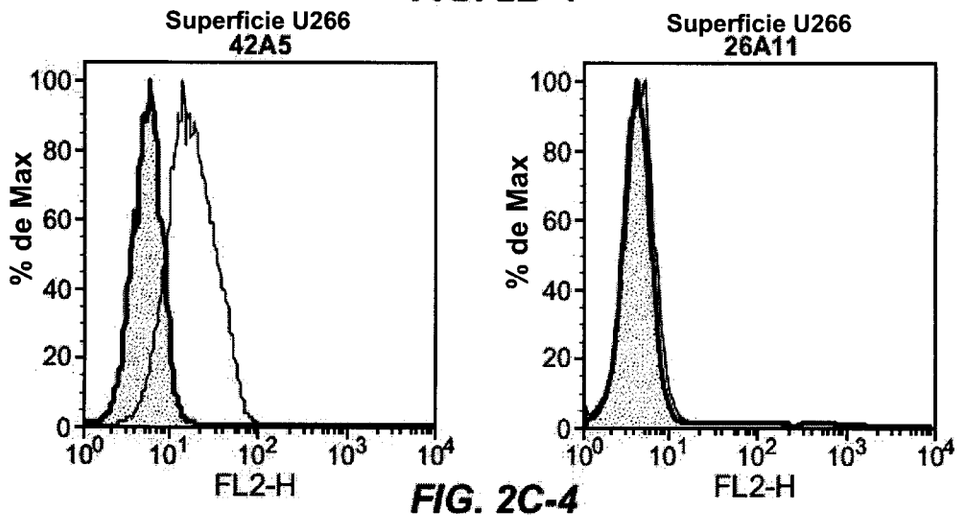


FIG. 2C-4

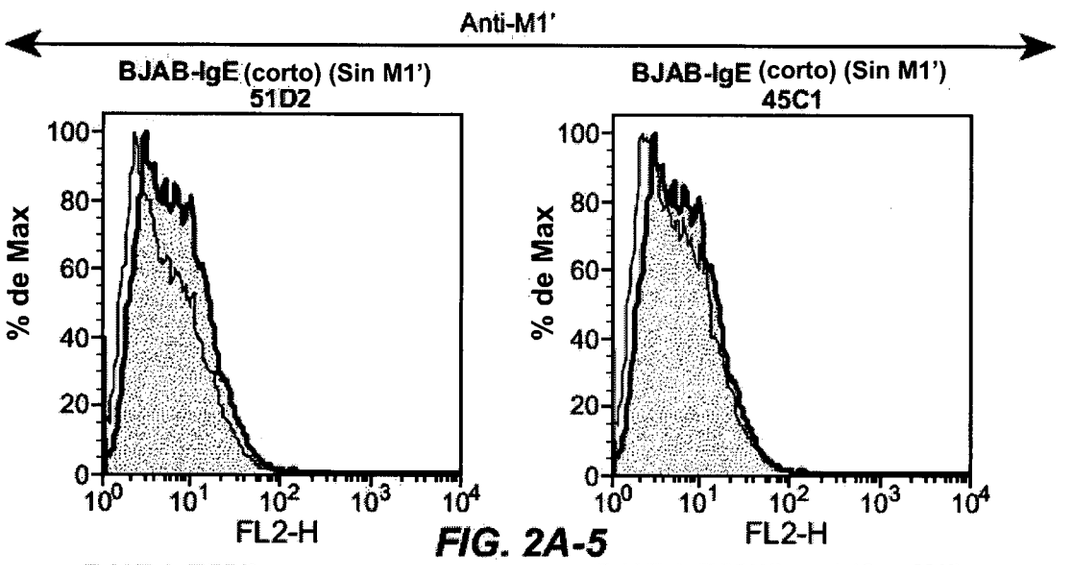


FIG. 2A-5

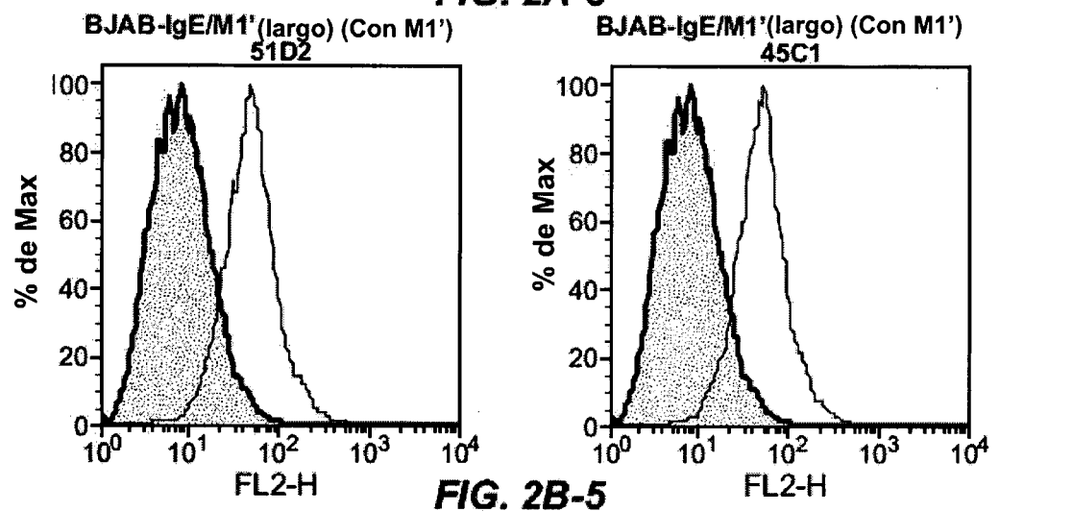


FIG. 2B-5

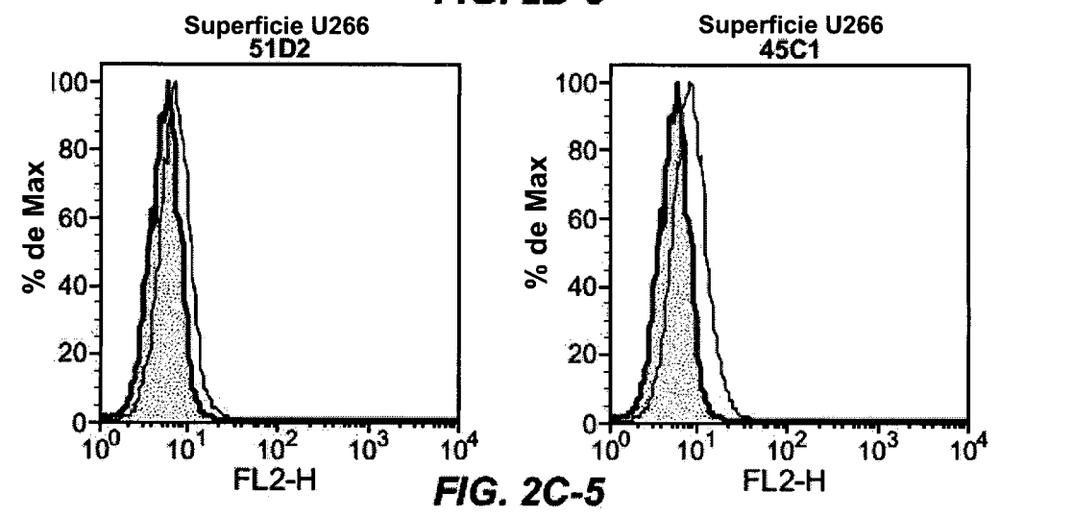


FIG. 2C-5

Anti-M1'

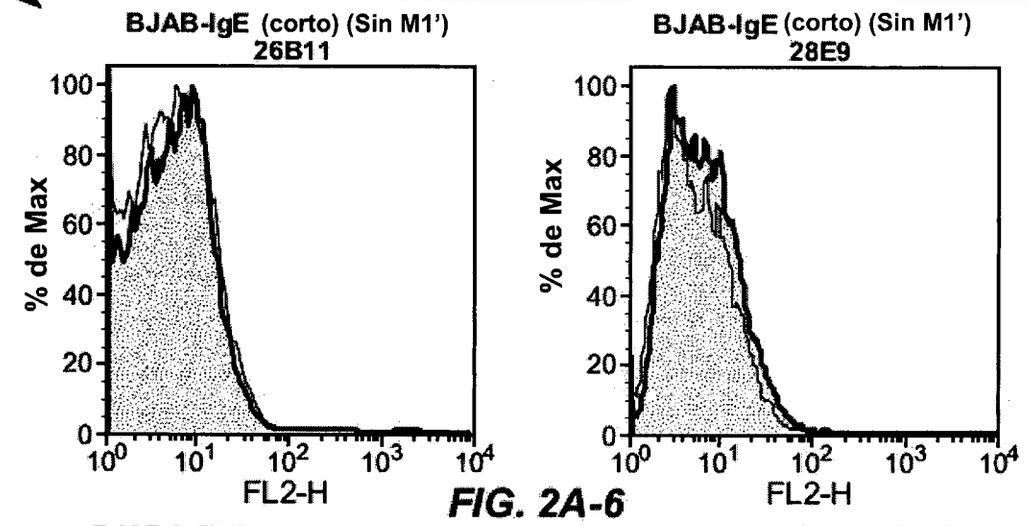


FIG. 2A-6

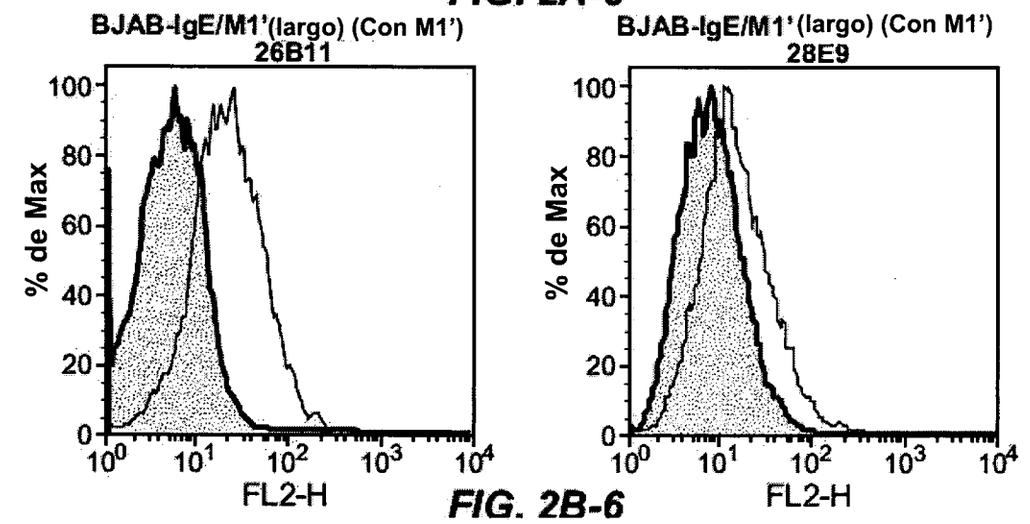


FIG. 2B-6

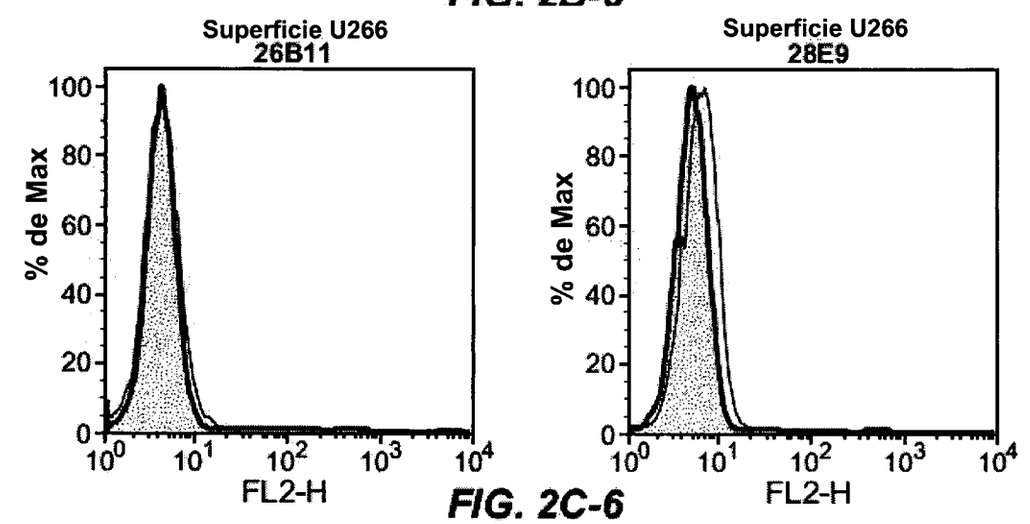


FIG. 2C-6

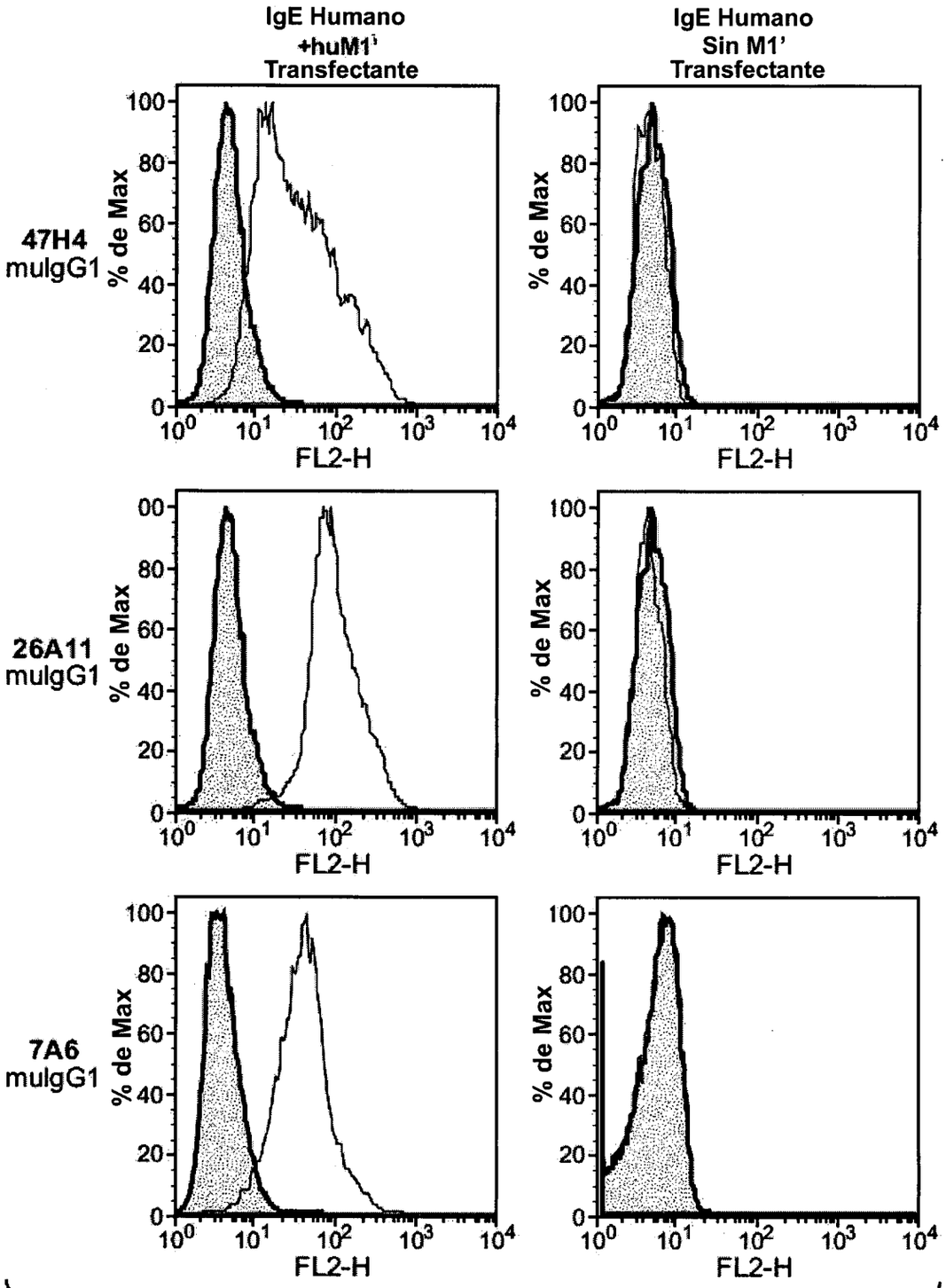

IgE Humano
+huM1'
Transfectante
IgE Humano
Sin M1'
Transfectante
47H4
mulgG1
26A11
mulgG1
7A6
mulgG1
% de Max
FL2-H

FIG. 2D

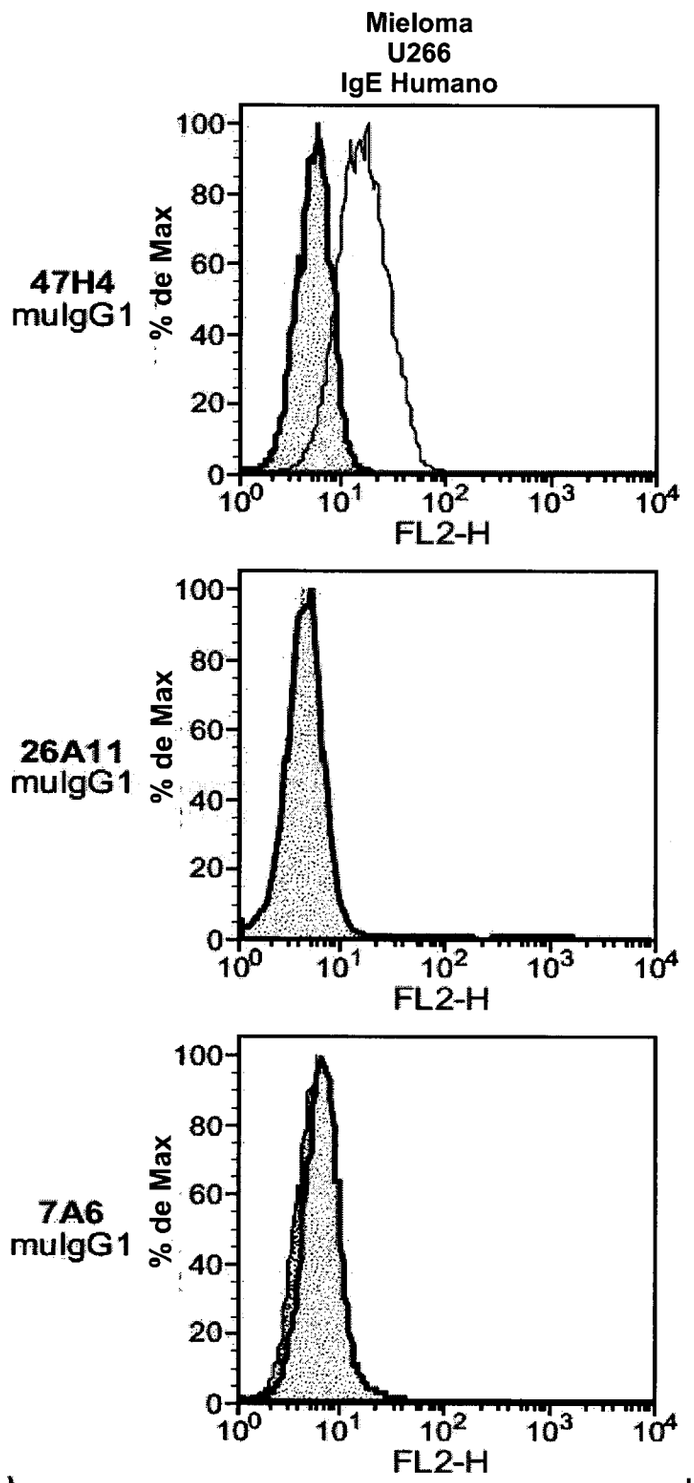

Mieloma
U266
IgE Humano
47H4
mulgG1
26A11
mulgG1
7A6
mulgG1
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 2E

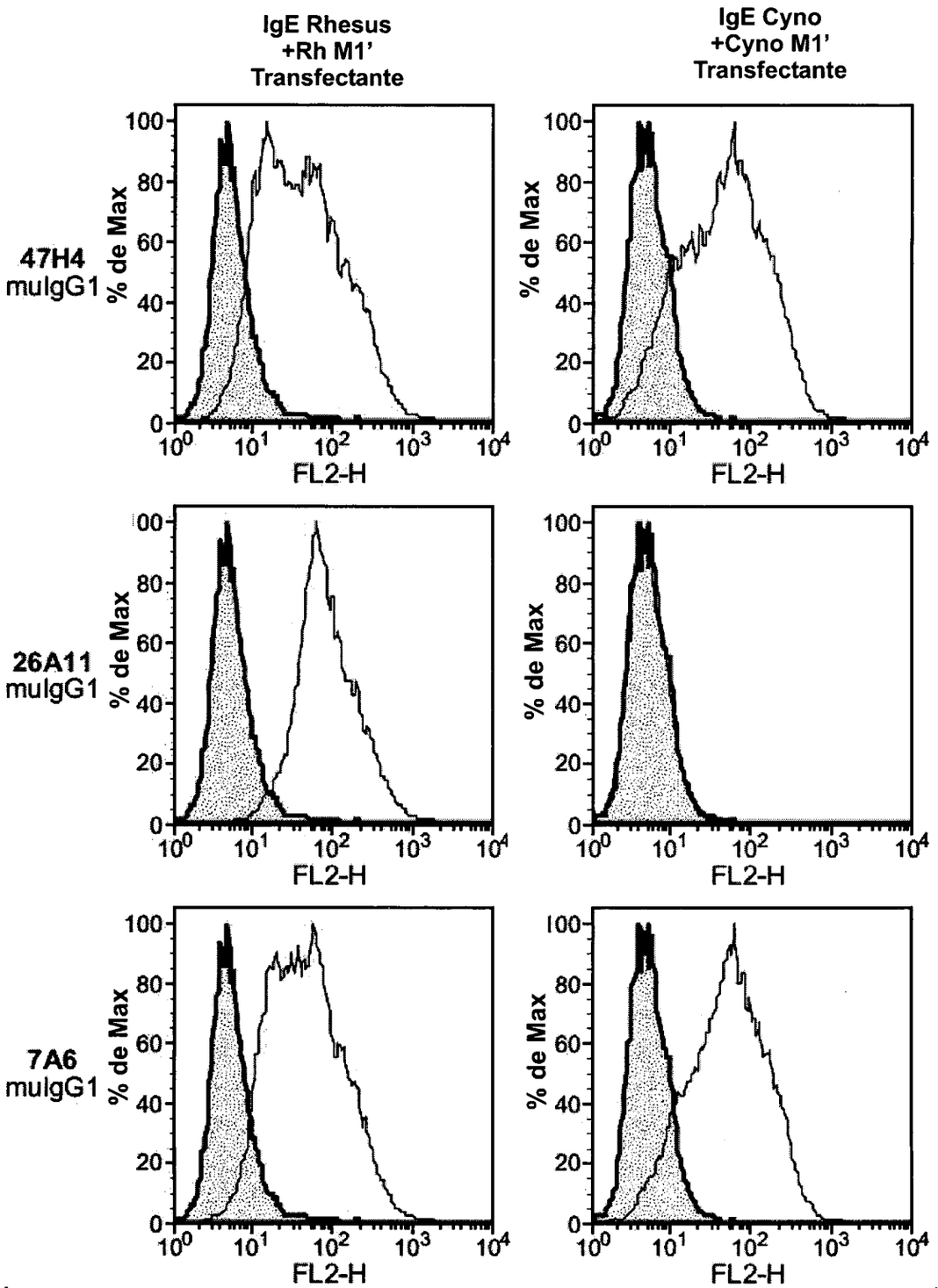

IgE Rhesus
+Rh M1'
Transfectante
IgE Cyno
+Cyno M1'
Transfectante
47H4
muIgG1
26A11
muIgG1
7A6
muIgG1
% de Max
FL2-H

FIG. 2F

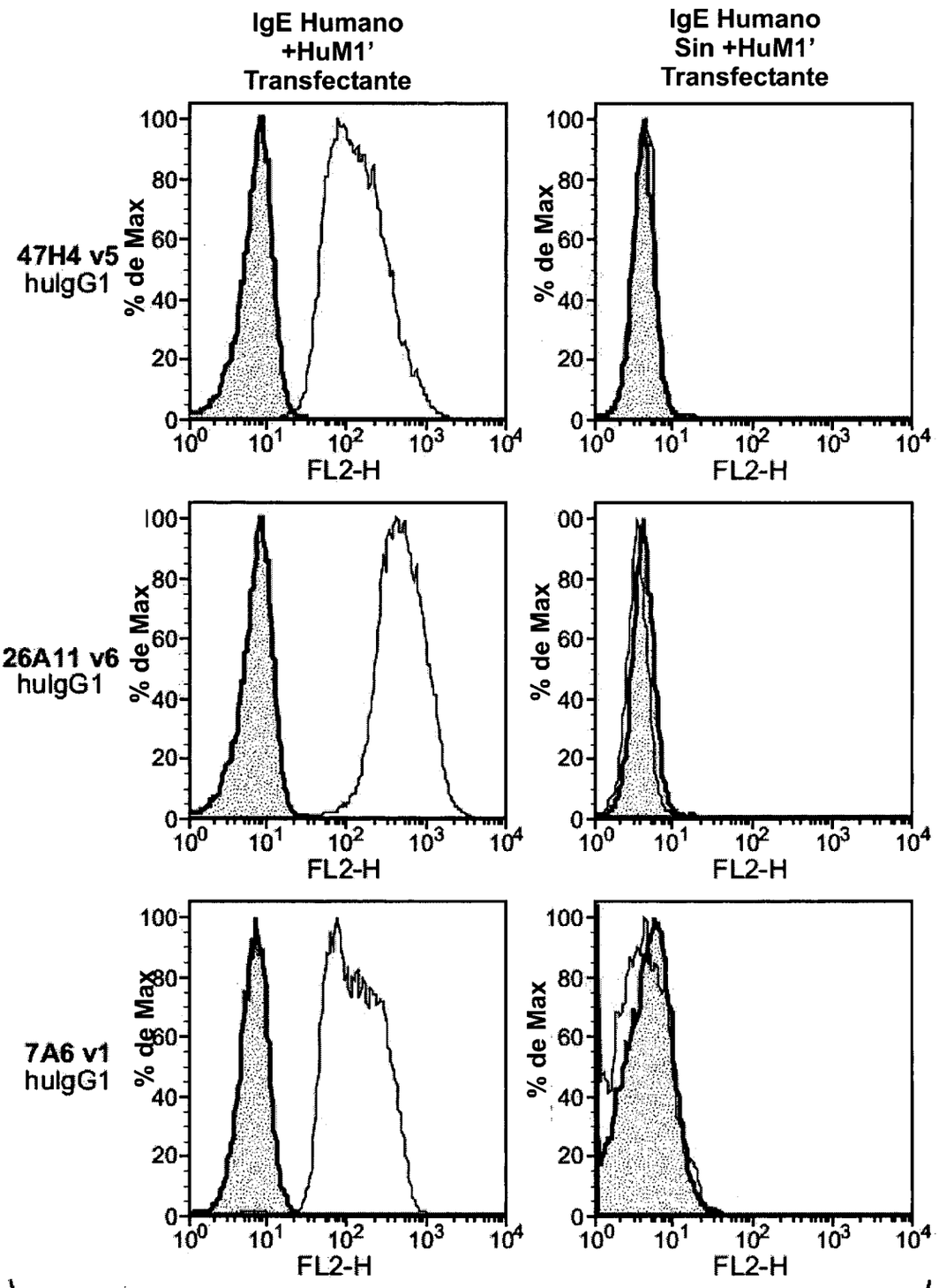

IgE Humano
+HuM1'
Transfectante
IgE Humano
Sin +HuM1'
Transfectante
47H4 v5
hulgG1
26A11 v6
hulgG1
7A6 v1
hulgG1
% de Max
FL2-H

FIG. 2G

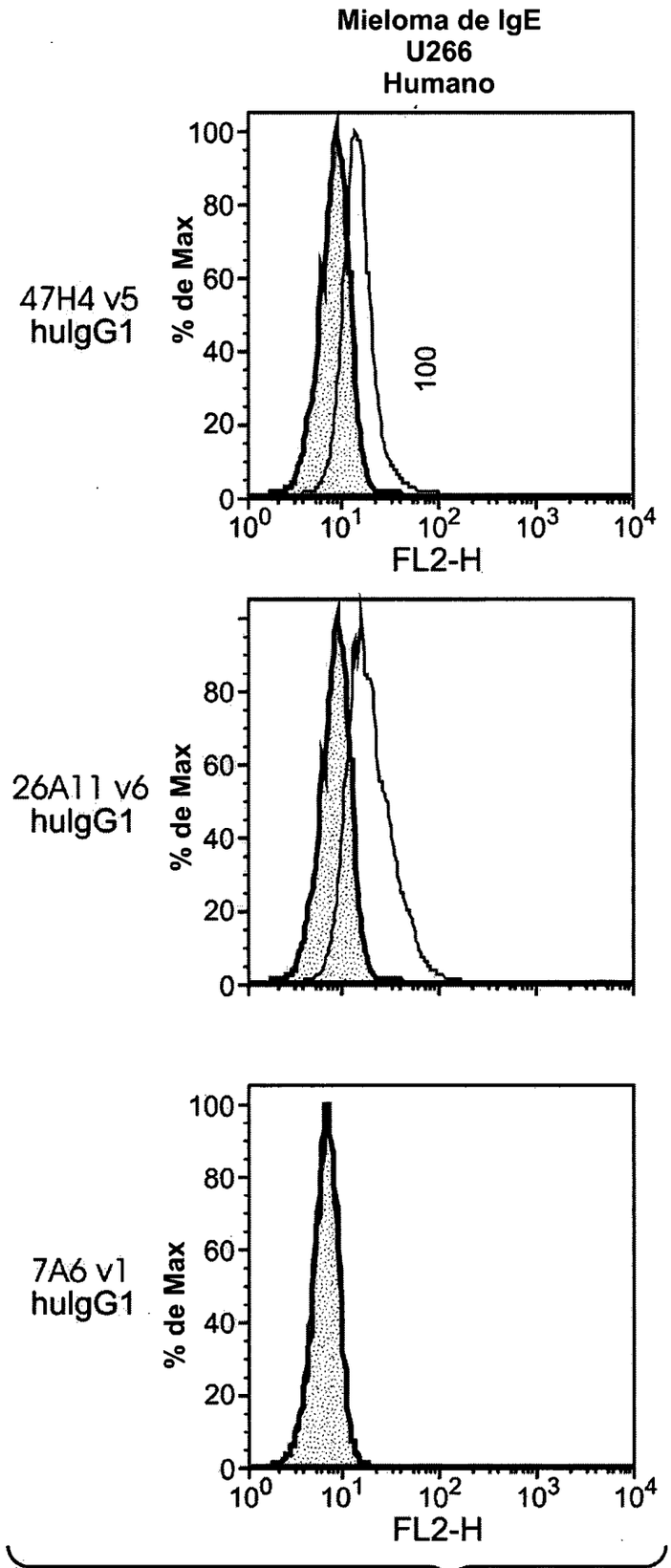

Mieloma de IgE
U266
Humano
47H4 v5
hulgG1
26A11 v6
hulgG1
7A6 v1
hulgG1
% de Max
100
FL2-H

FIG. 2H

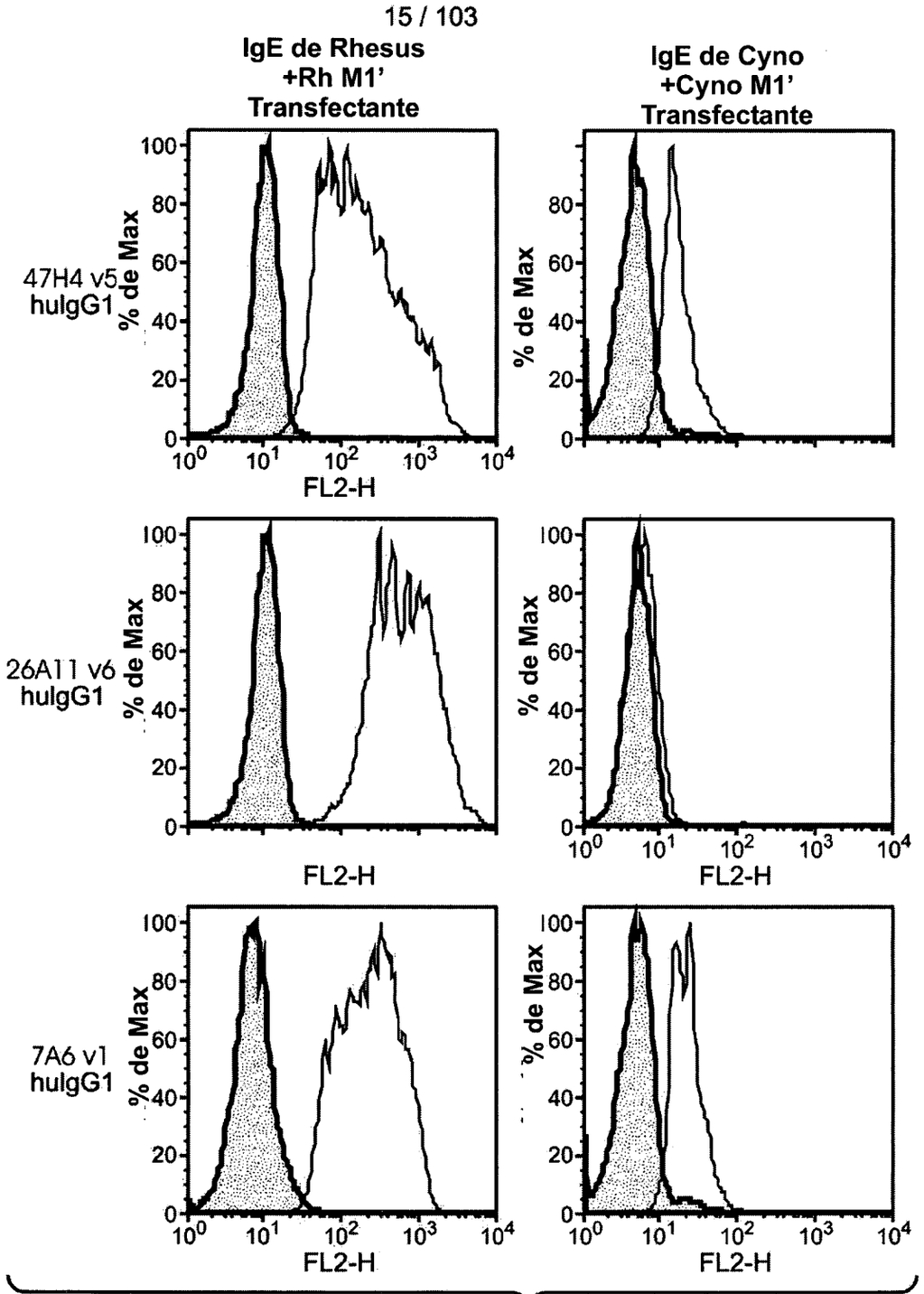

IgE de Rhesus
+Rh M1'
Transfectante
IgE de Cyno
+Cyno M1'
Transfectante
47H4 v5
hulgG1
26A11 v6
hulgG1
7A6 v1
hulgG1
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 2I

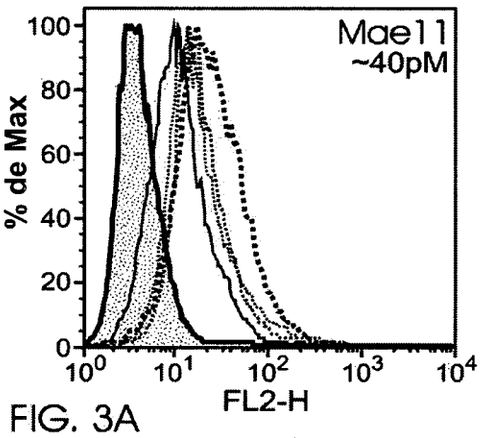


FIG. 3A

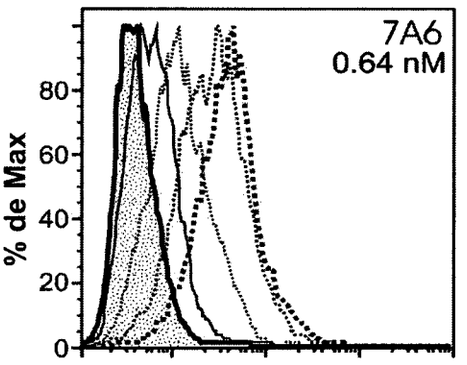


FIG. 3B

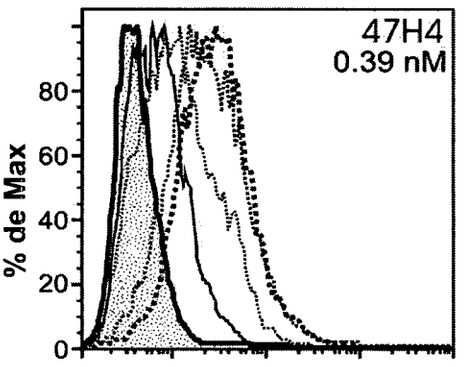


FIG. 3C

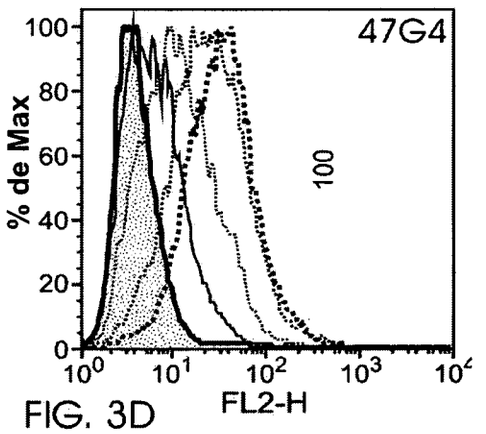


FIG. 3D

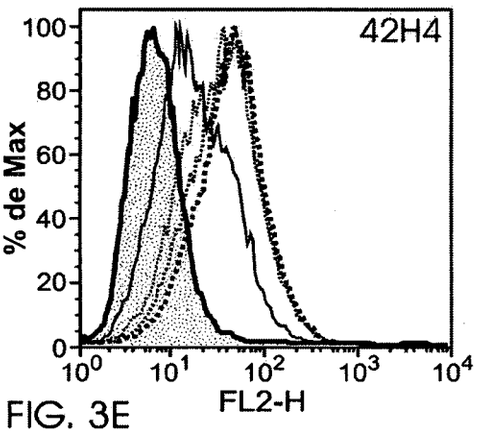


FIG. 3E

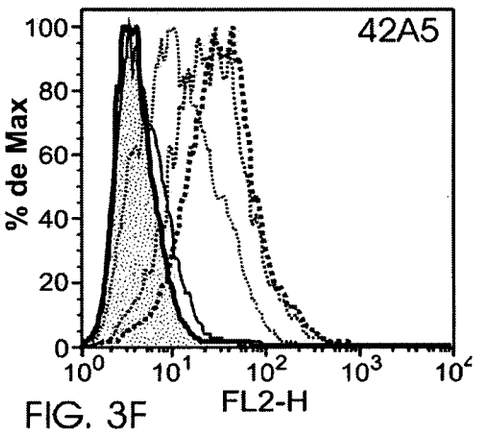


FIG. 3F

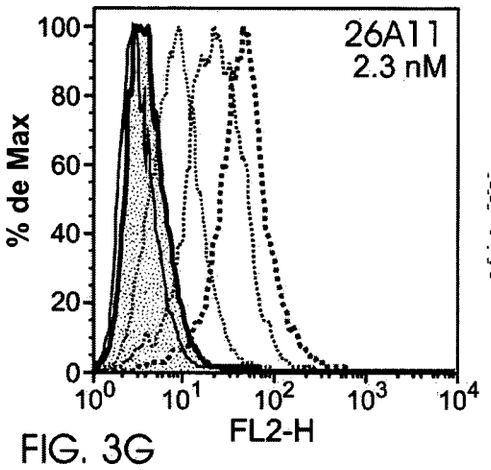


FIG. 3G

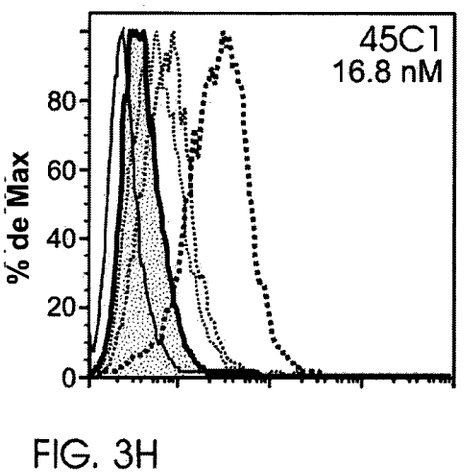


FIG. 3H

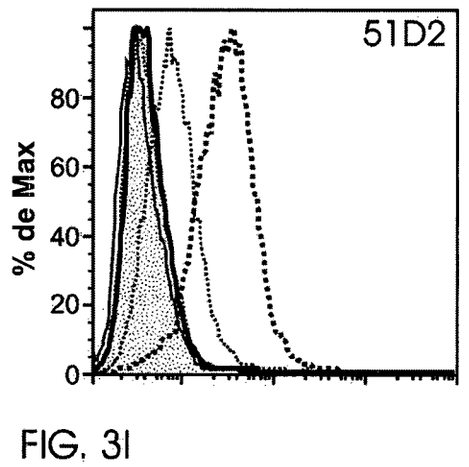


FIG. 3I

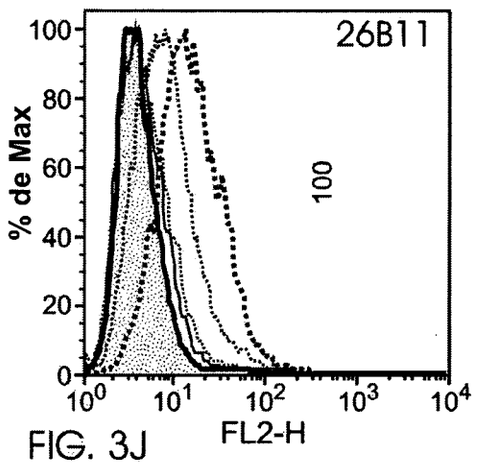


FIG. 3J

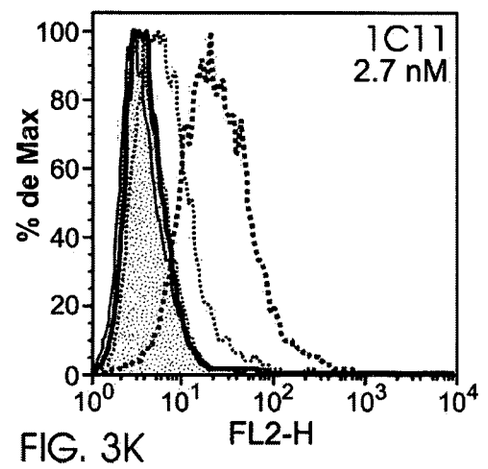


FIG. 3K

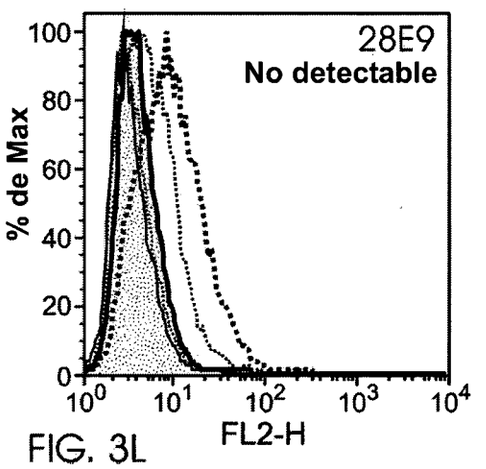


FIG. 3L

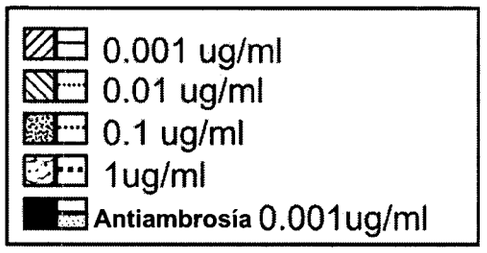


FIG. 3M

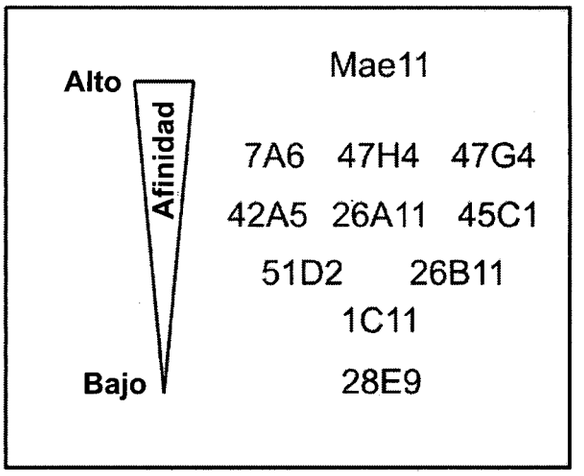


FIG. 3N

Afinidades de Unión de Anti-IgE/M1' Humanizado

	Scatchard Humano M1' (nM)			Scatchard Rhesus M1' (nM)	Scatchard Cyno M1' (nM)
	Medición	Media	D.E.		
47H4 mIgG1				0.77	0.97
-exp. 1	0.83	0.79			
-exp. 2	0.53	0.54			
-exp. 3	0.40	0.39			
General		0.57	0.190936		
26A11 mIgG1					
-exp. 1	1.68 2.59	2.14			
-exp. 2	1.20 2.30	1.75			
General		1.94	0.623772		
7A6 mIgG1	0.64			na	na

FIG. 3O

	Scatchard Human M1' (nM)	Scatchard Rhesus M1' (nM)	Scatchard Cyno M1' (nM)
47H4 v5 hulgG1	1.5	1.3	2.5
47H4 v2 hulgG1	0.54	na	na
47H4 v1 hulgG1	0.37	na	na
26A11 v6 hulgG1	1.85	na	na
26A11 v14 hulgG1	1.5	na	na
26A11 v1 hulgG1	1.06	na	na

FIG. 3P

FIG. 4A-1	FIG. 4A-2	FIG. 4A-3	FIG. 4A-4	FIG. 4A-5
FIG. 4A-6	FIG. 4A-7	FIG. 4A-8	FIG. 4A-9	FIG. 4A-10
FIG. 4A-11	FIG. 4A-12	FIG. 4A-13	FIG. 4A-14	FIG. 4A-15
FIG. 4A-16	FIG. 4A-17	FIG. 4A-18	FIG. 4A-19	FIG. 4A-20

FIG. 4A

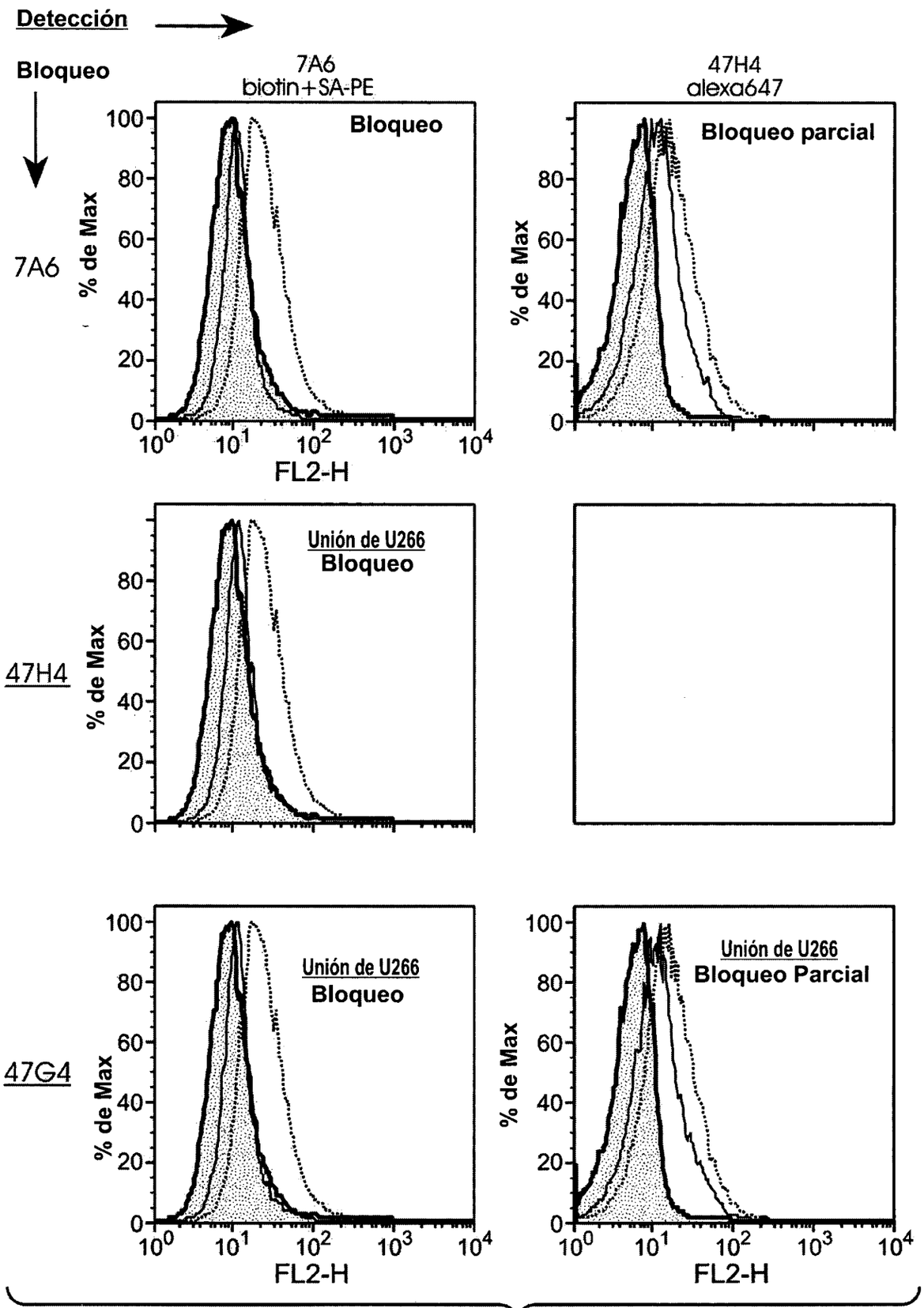

Detección
Bloqueo
7A6
7A6
biotin+SA-PE
47H4
alexa647
Bloqueo
Bloqueo parcial
47H4
Unión de U266
Bloqueo
47G4
Unión de U266
Bloqueo
Unión de U266
Bloqueo Parcial
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-1

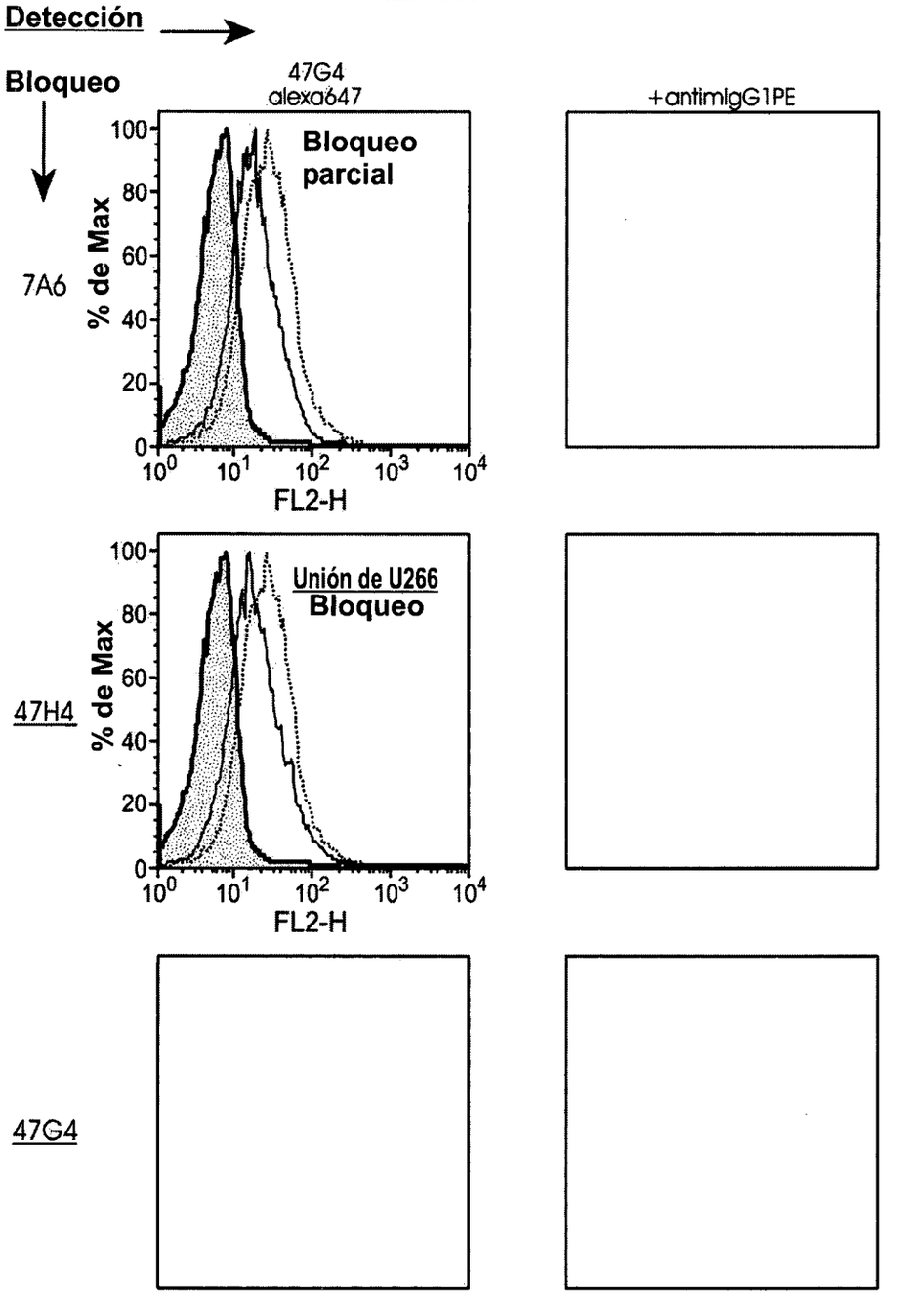

Detección
Bloqueo
47G4 alexa647
+antimIgG1PE
7A6
47H4
47G4
% de Max
FL2-H
Bloqueo parcial
Unión de U266
Bloqueo
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-2

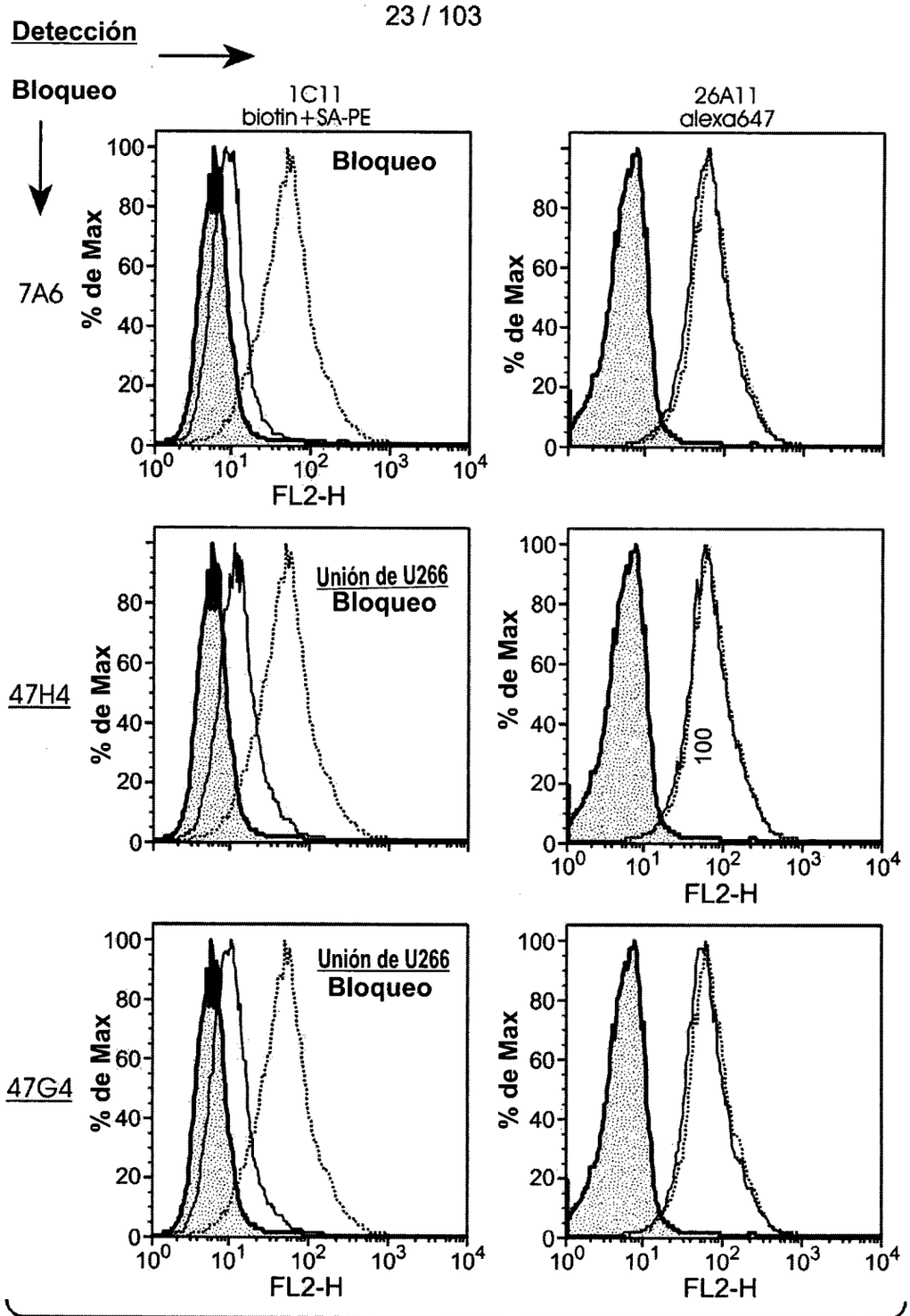

Detección
Bloqueo
1C11
biotin+SA-PE
26A11
alexa647
7A6
47H4
47G4
Bloqueo
Unión de U266
Bloqueo
% de Max
FL2-H
100

FIG. 4A-3

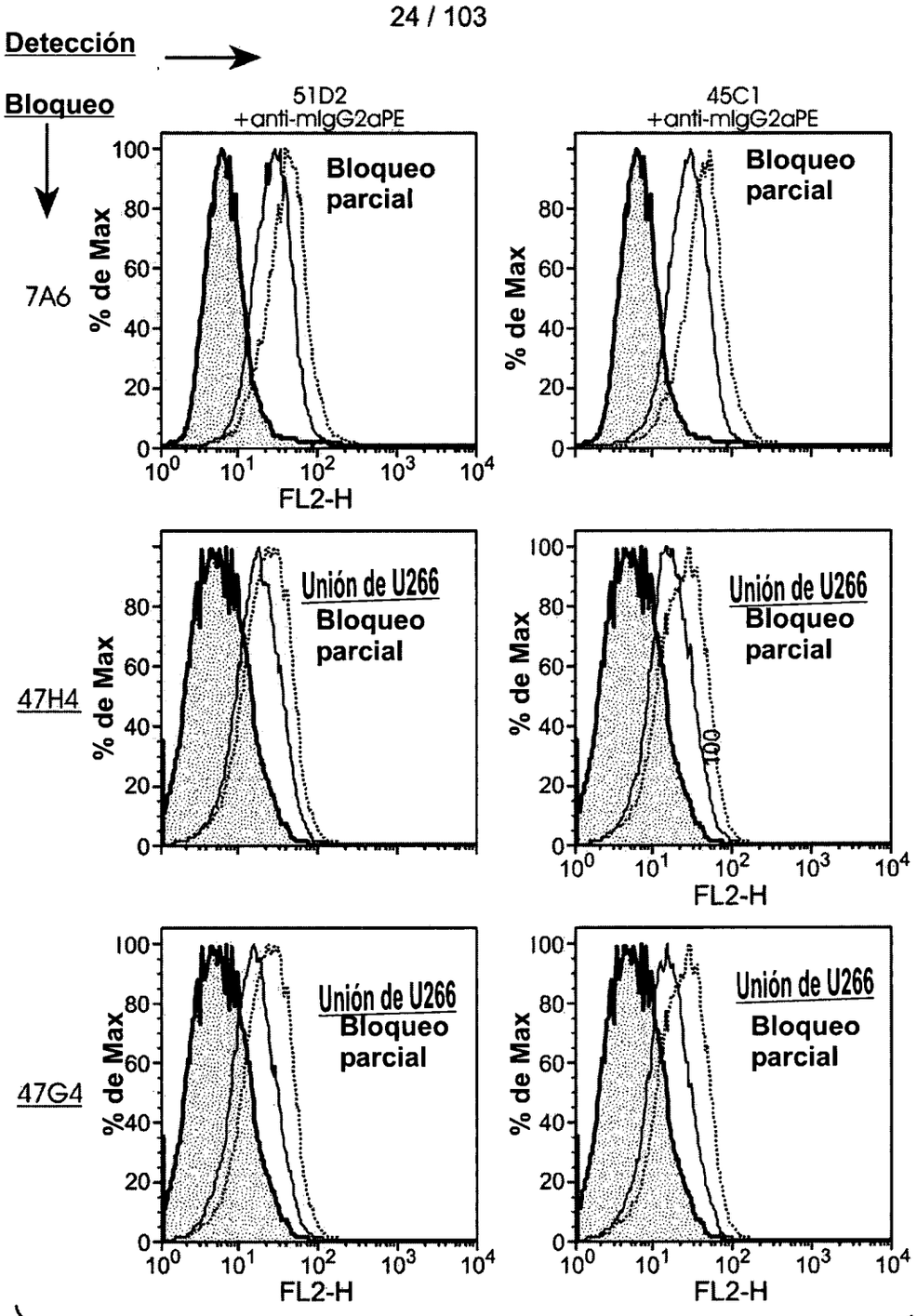

Detección
Bloqueo
51D2
+anti-mIgG2aPE
45C1
+anti-mIgG2aPE
7A6
47H4
47G4
% de Max
FL2-H
Bloqueo parcial
Unión de U266
Bloqueo parcial
100

FIG. 4A-4

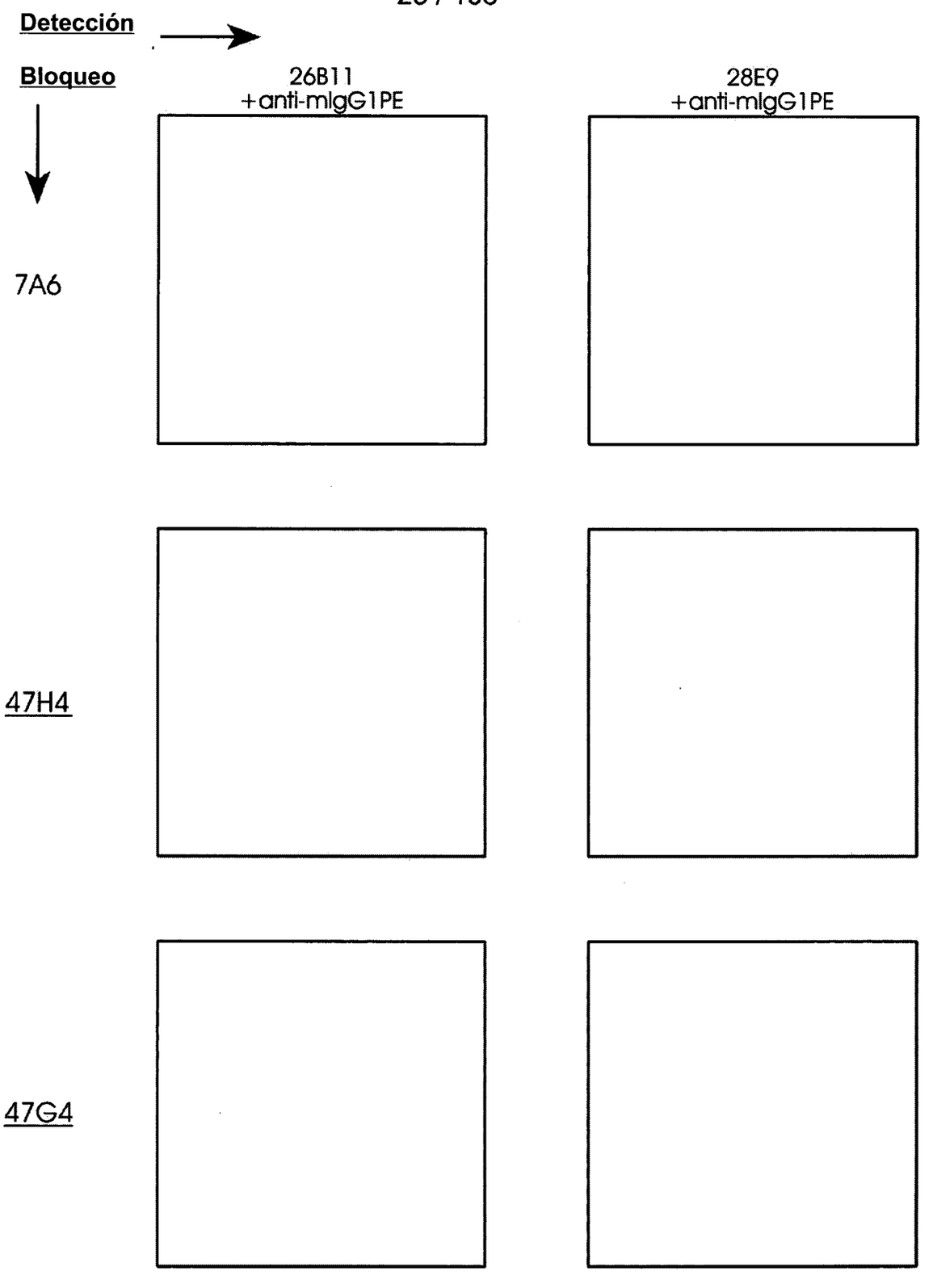

Detección
Bloqueo
26B11
+anti-mIgG1PE
28E9
+anti-mIgG1PE
7A6
47H4
47G4

FIG. 4A-5

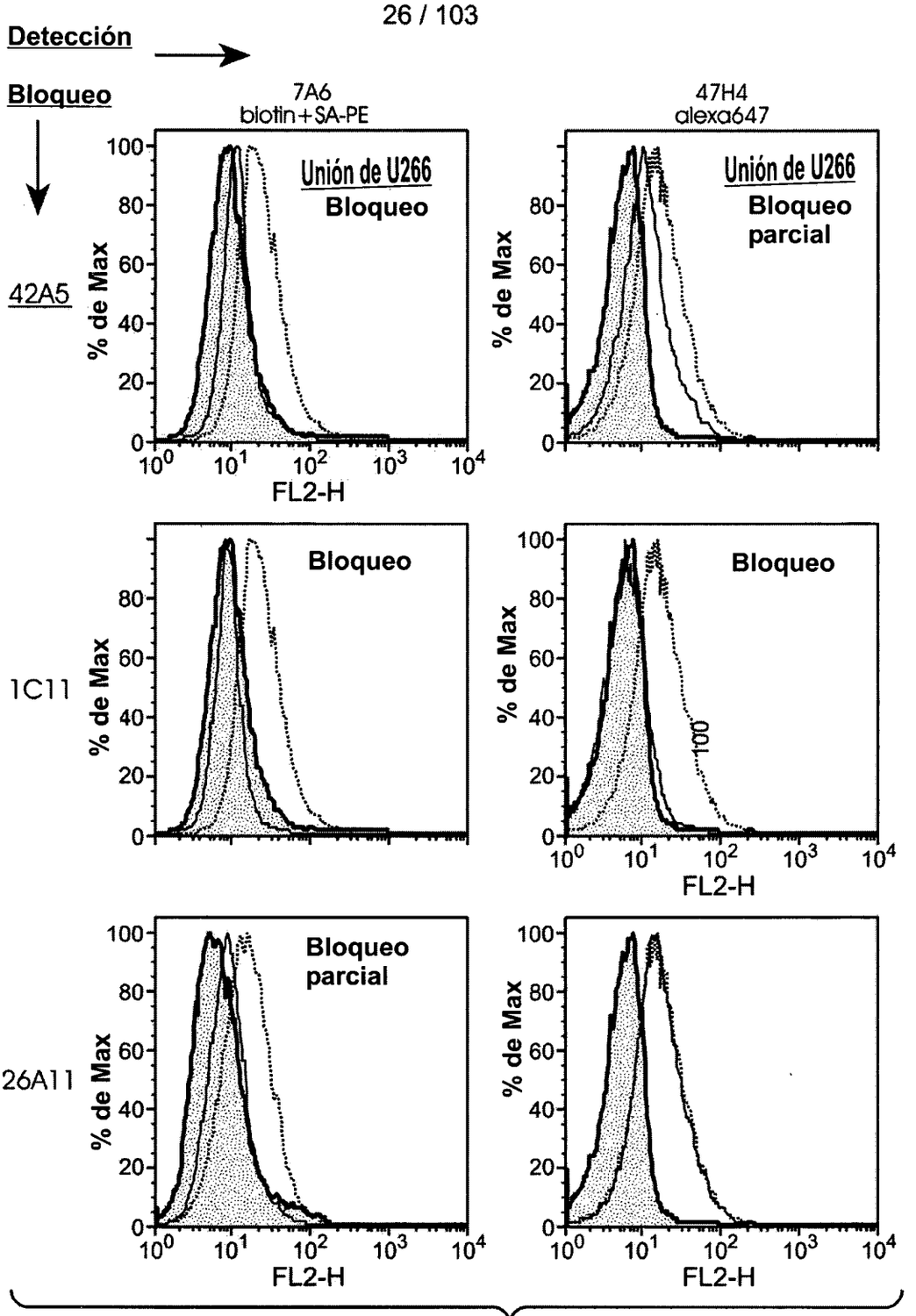

Detección
Bloqueo
7A6
biotin+SA-PE
47H4
alexa647
Unión de U266
Bloqueo
Unión de U266
Bloqueo
parcial
42A5
1C11
26A11
% de Max
FL2-H
100

FIG. 4A-6

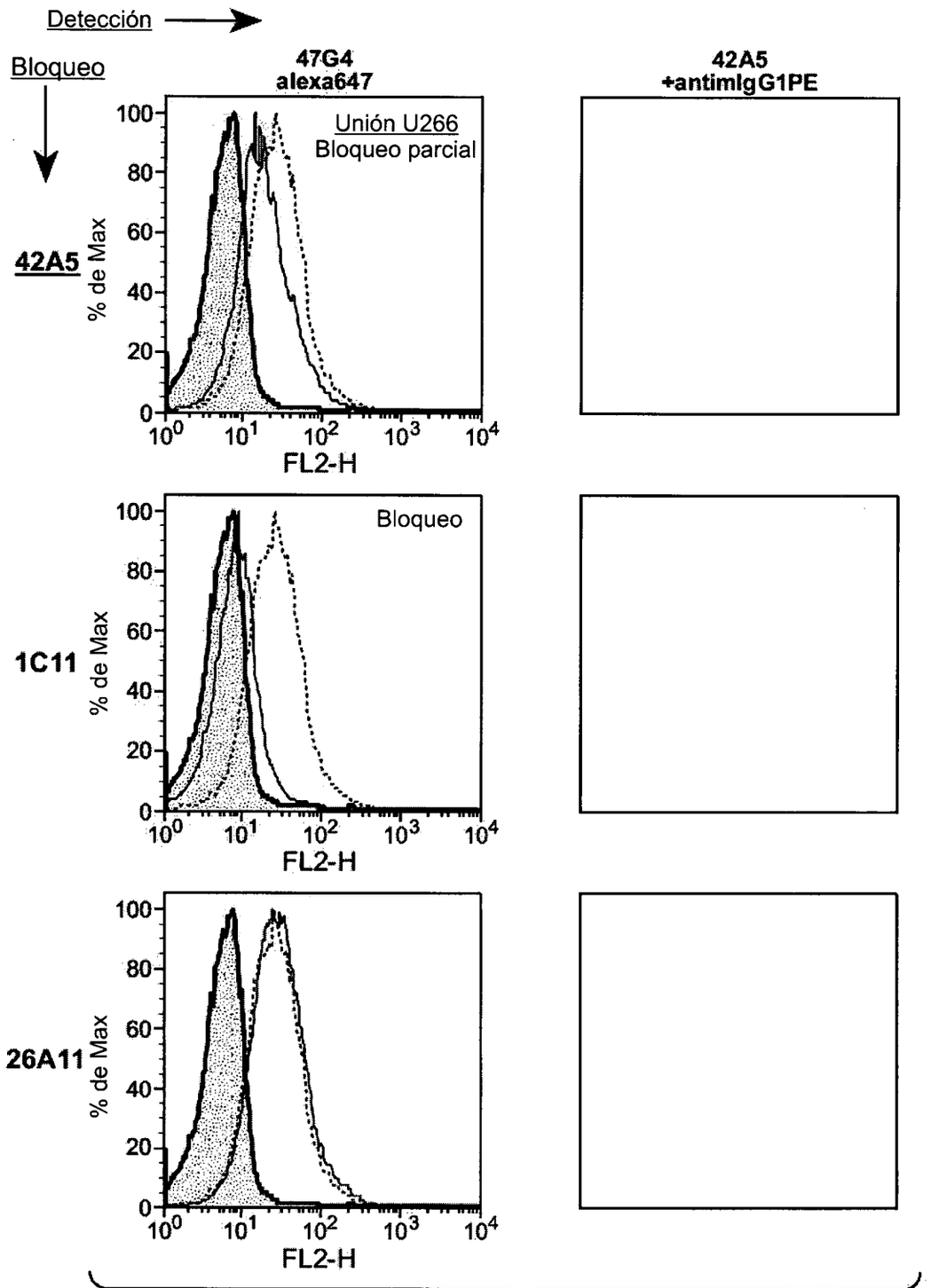

Detección
Bloqueo
47G4
alexa647
42A5
+antimIgG1PE
Unión U266
Bloqueo parcial
42A5
Bloqueo
1C11
26A11
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-7

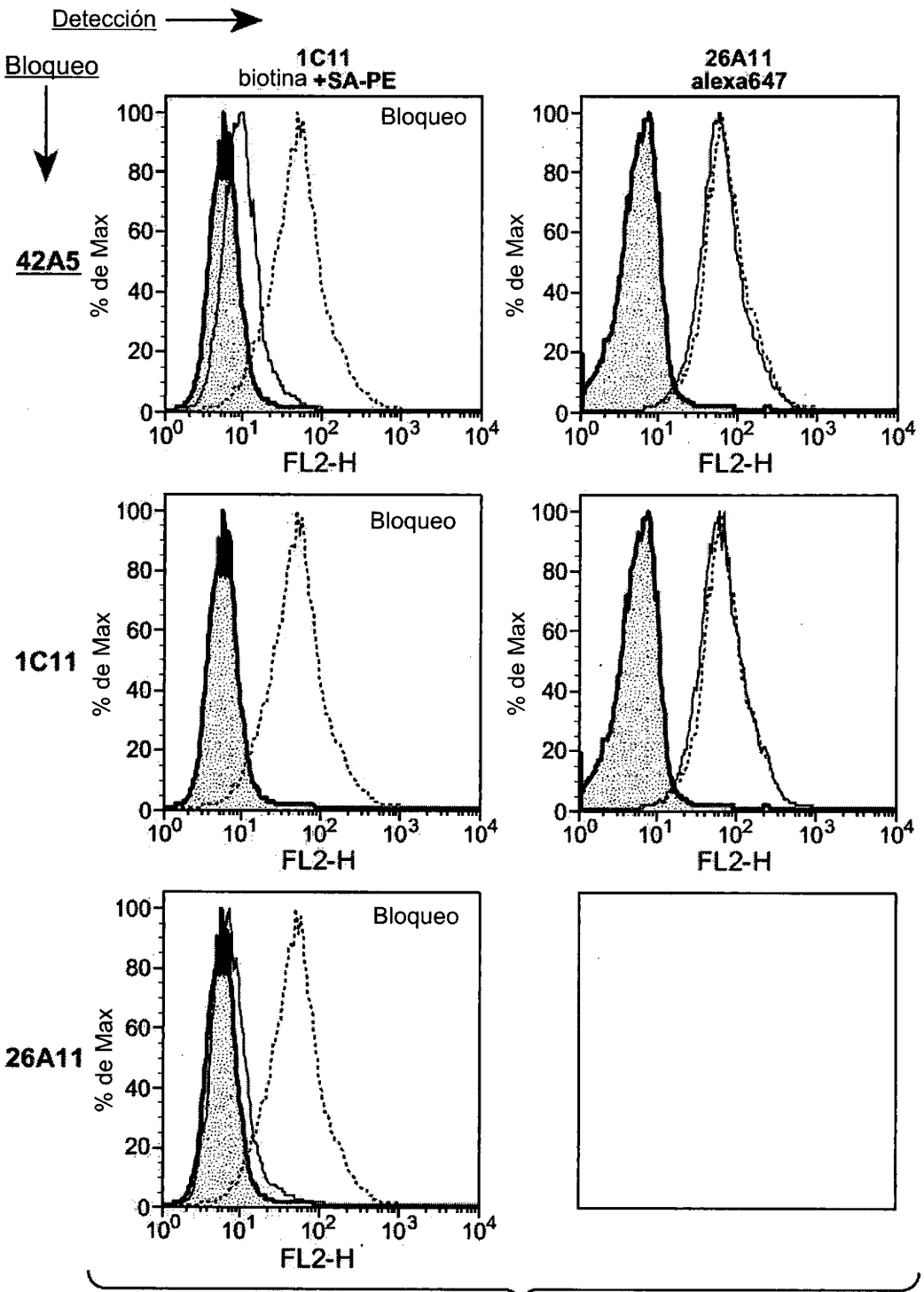

Detección
Bloqueo
1C11
biotina +SA-PE
26A11
alexa647
42A5
1C11
26A11
Bloqueo
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-8

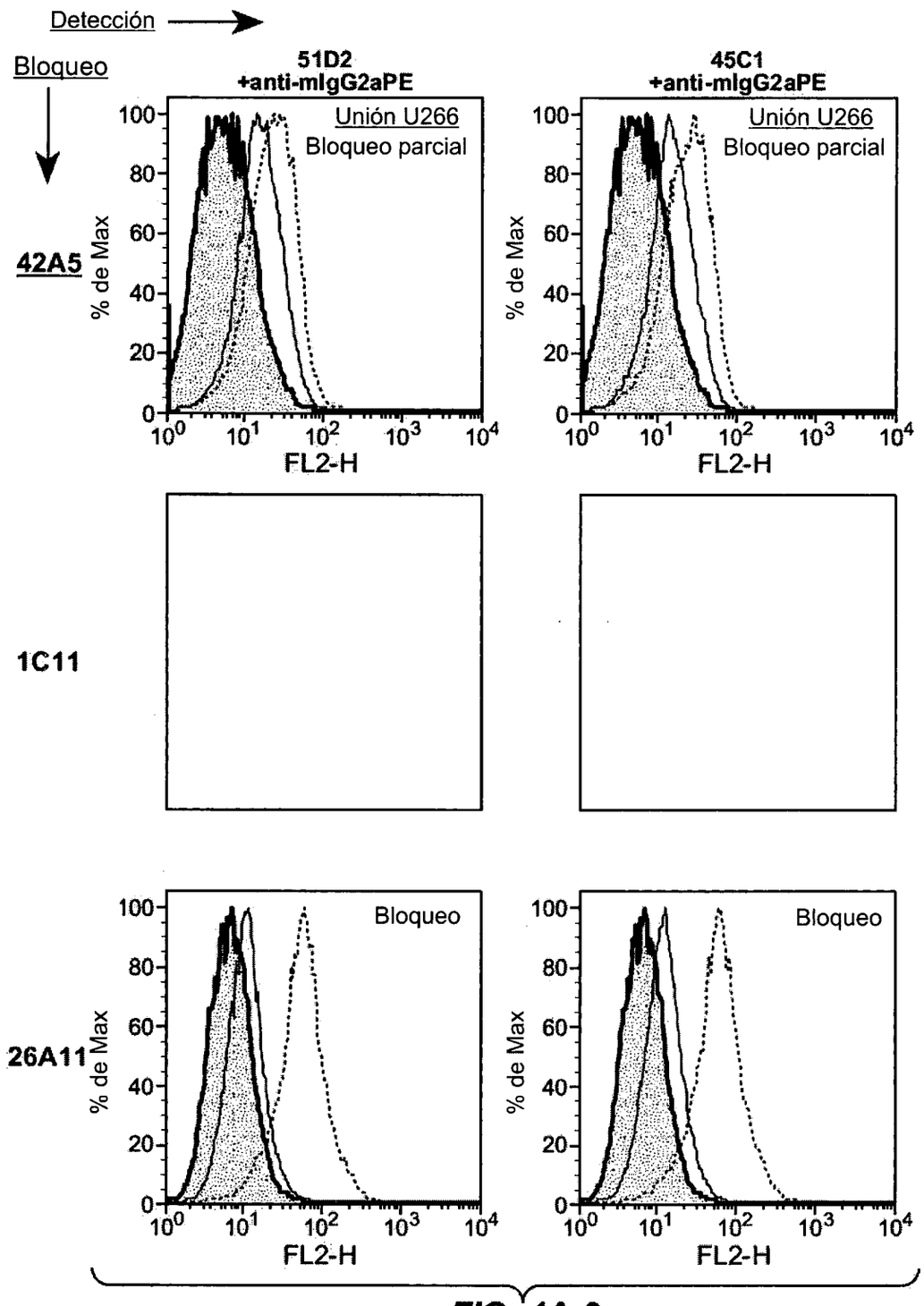

Detección
Bloqueo
51D2
+anti-mIgG2aPE
45C1
+anti-mIgG2aPE
Unión U266
Bloqueo parcial
Bloqueo
42A5
1C11
26A11
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-9

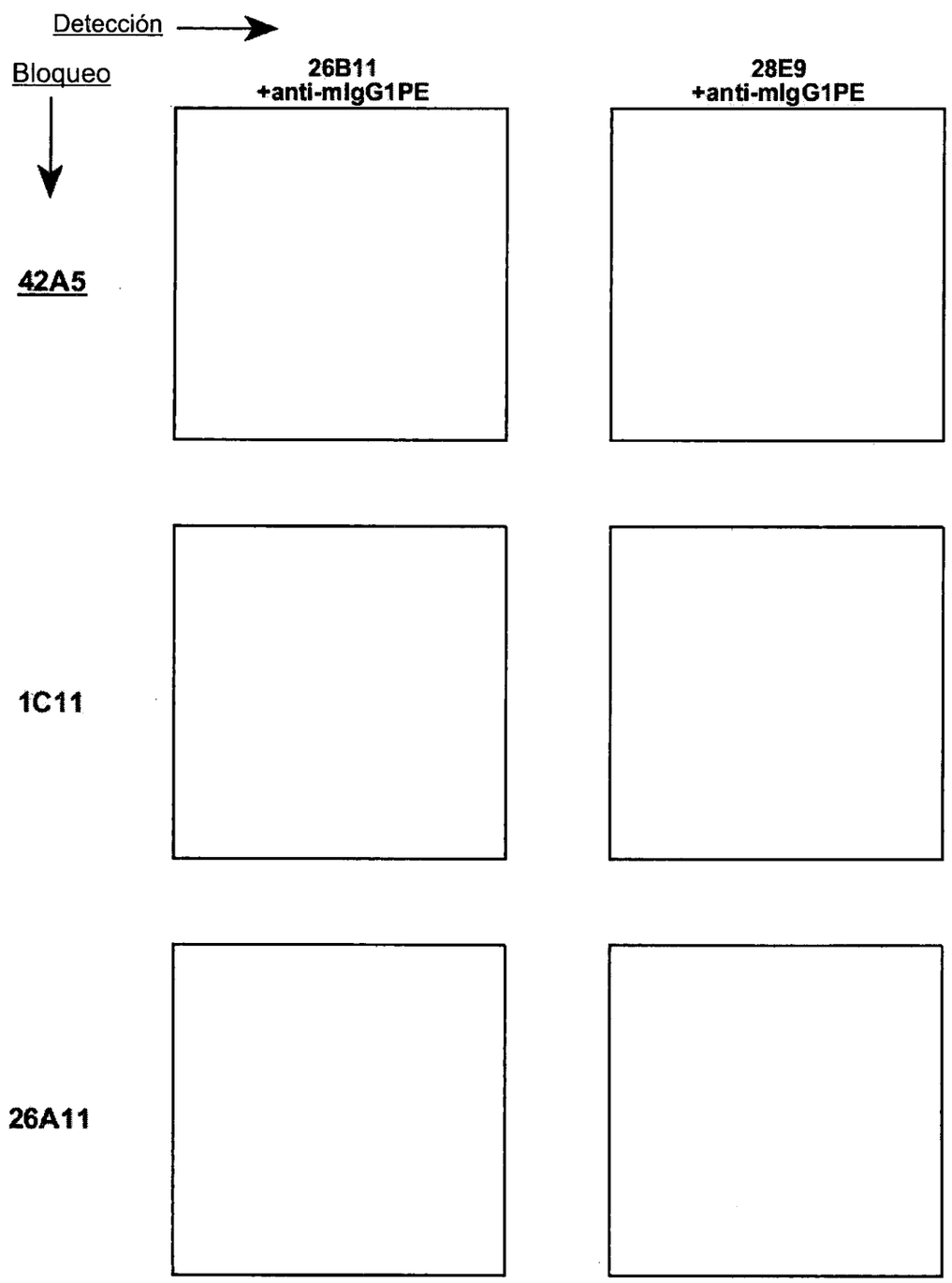

Detección
Bloqueo
26B11
+anti-mIgG1PE
28E9
+anti-mIgG1PE
42A5
1C11
26A11

FIG. 4A-10

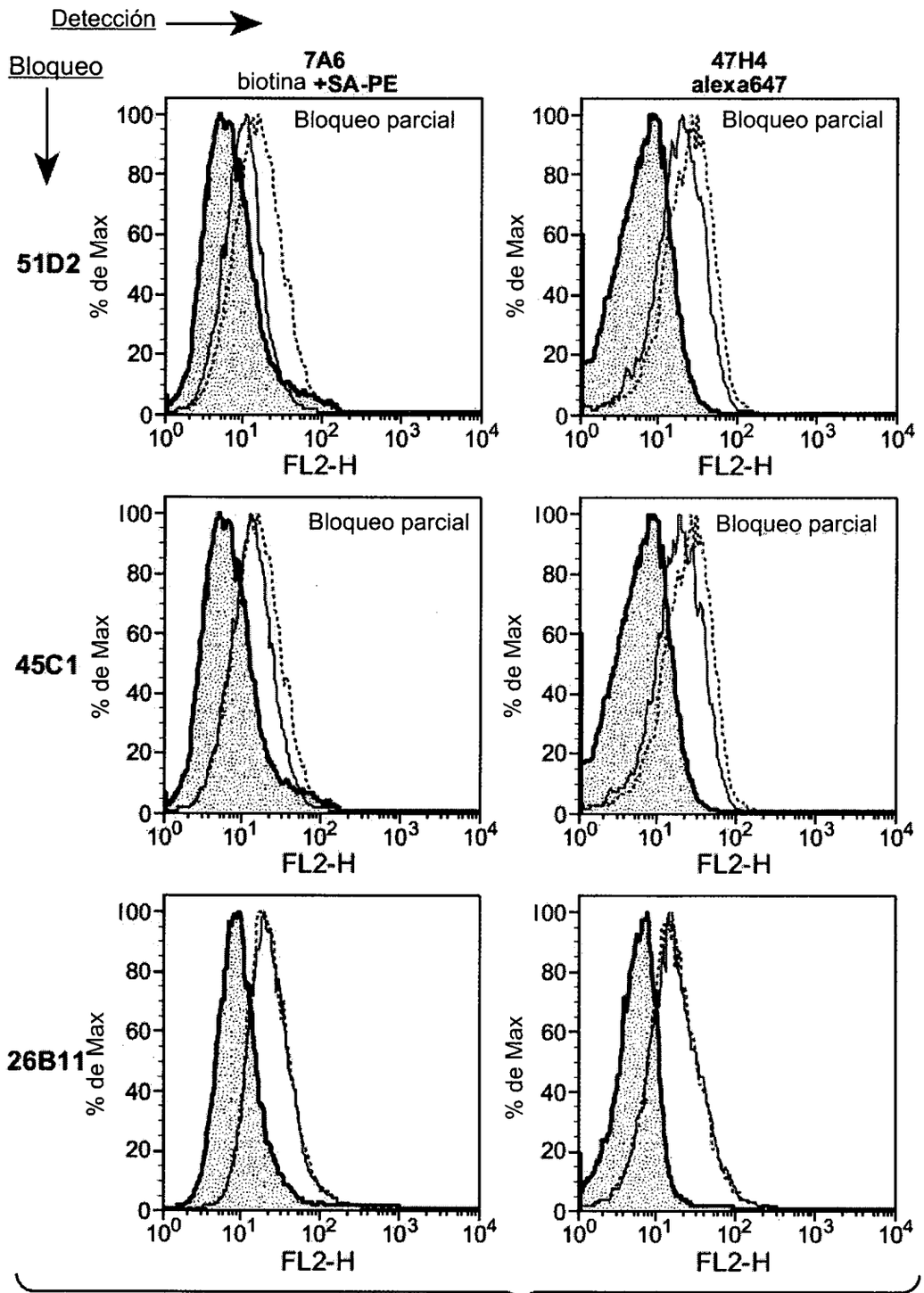

Detección
Bloqueo
7A6
biotina +SA-PE
47H4
alexa647
Bloqueo parcial
51D2
45C1
26B11
% de Max
FL2-H

FIG. 4A-11

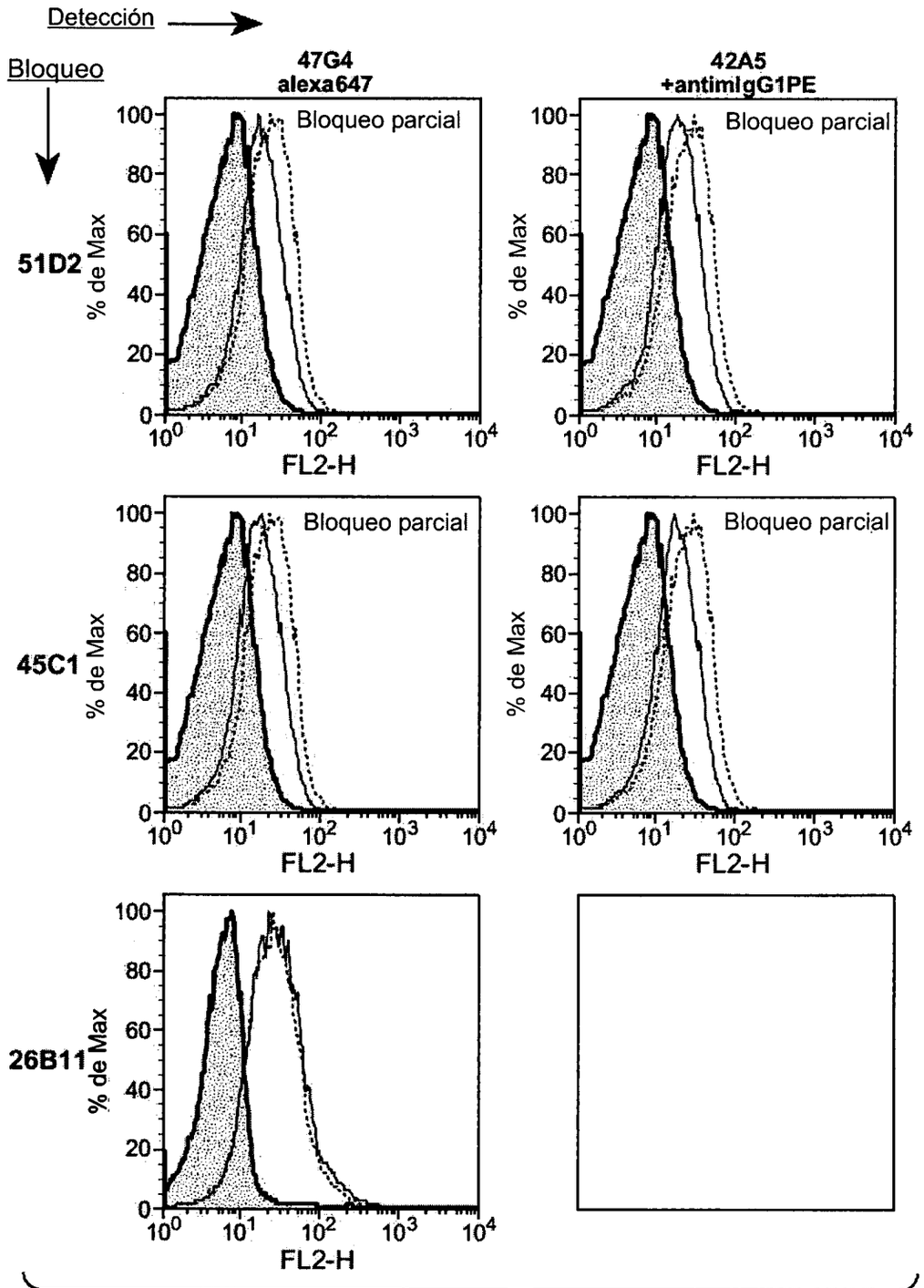

Detección
Bloqueo
47G4
alexa647
42A5
+antimIgG1PE
Bloqueo parcial
51D2
45C1
26B11
% de Max
FL2-H

FIG. 4A-12

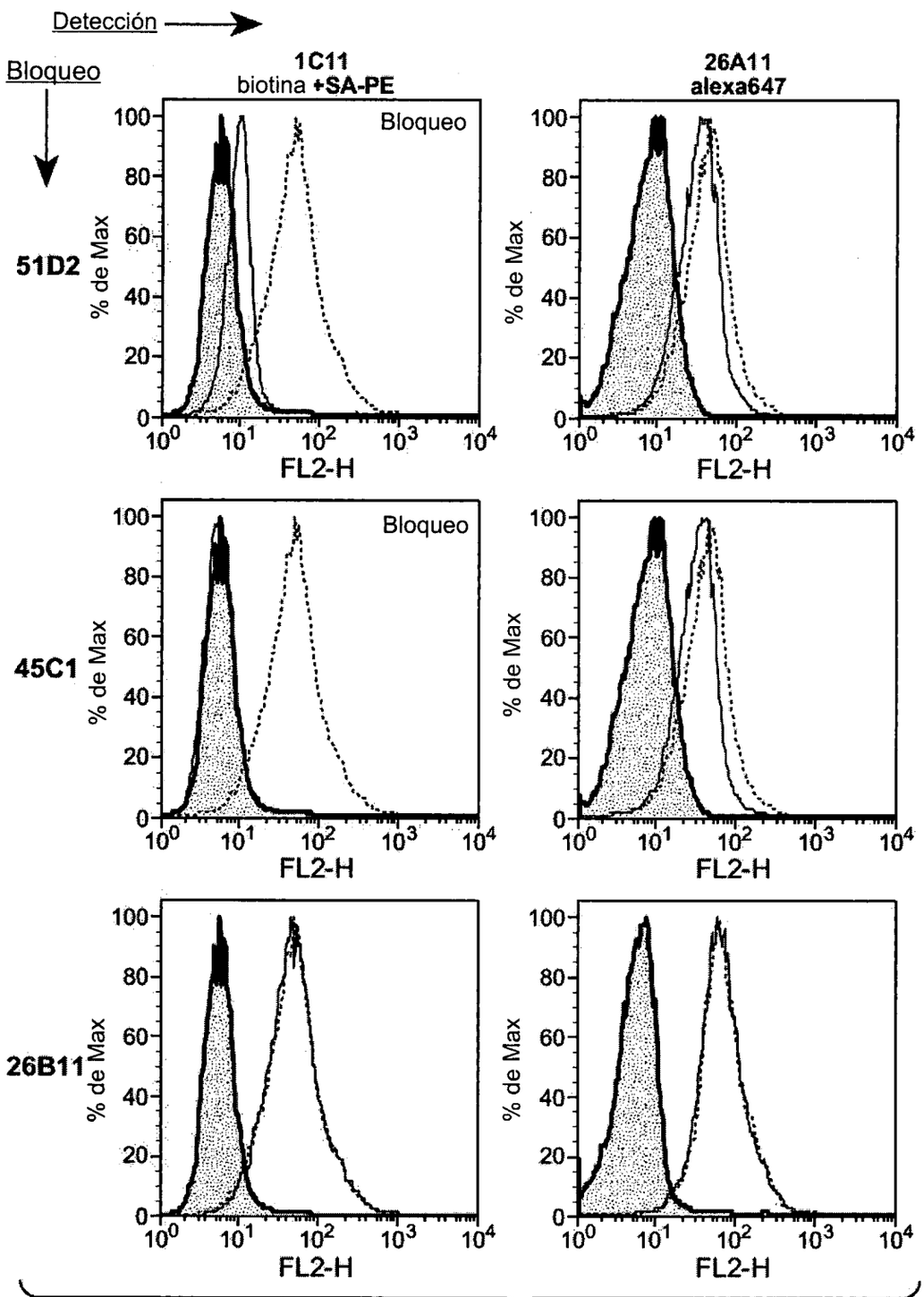

Detección
Bloqueo
1C11
biotina +SA-PE
26A11
alexa647
51D2
45C1
26B11
Bloqueo
% de Max
FL2-H
0
20
40
60
80
100
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-13

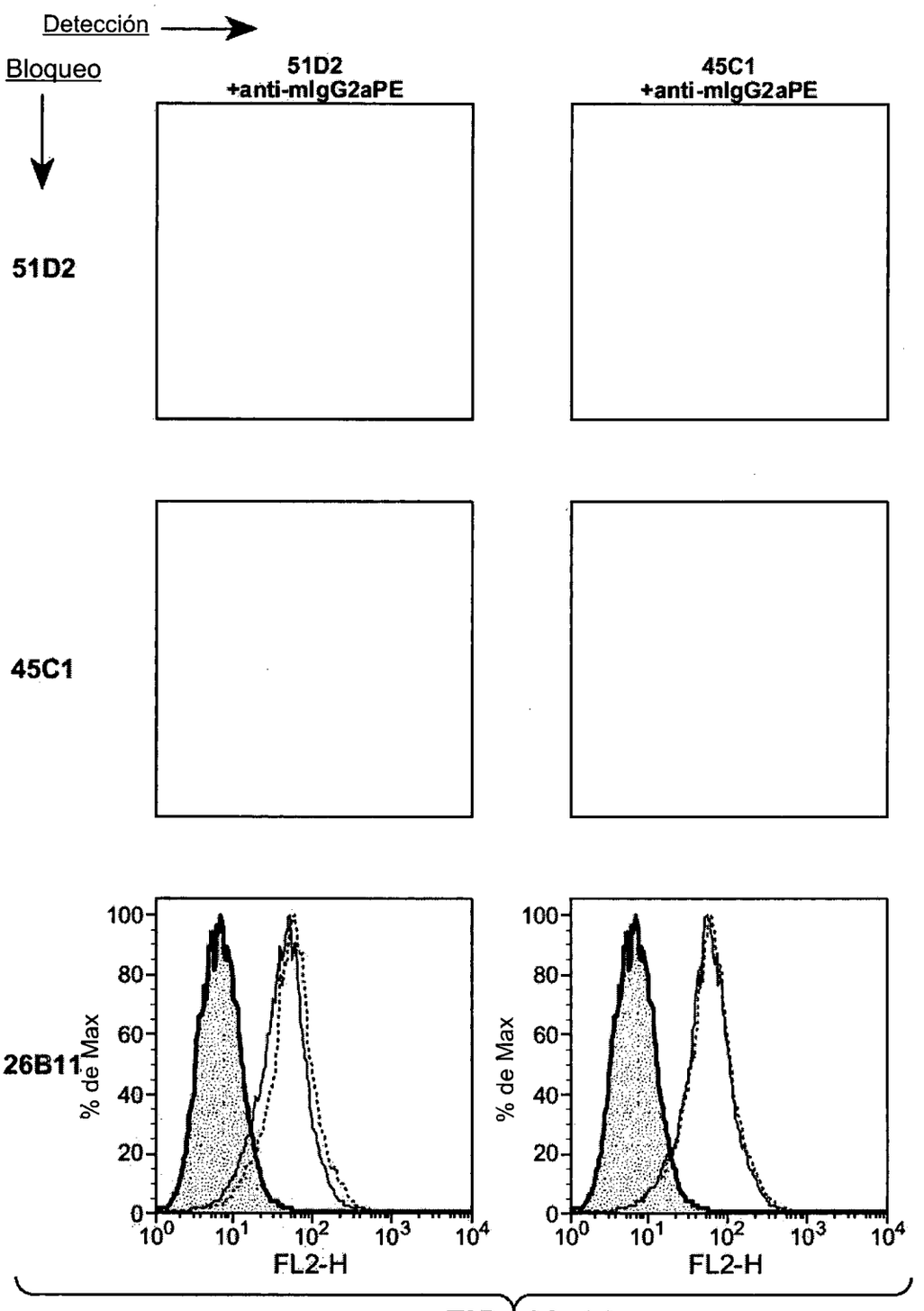

Detección
Bloqueo
51D2
+anti-mIgG2aPE
45C1
+anti-mIgG2aPE
51D2
45C1
26B11
% de Max
FL2-H
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-14

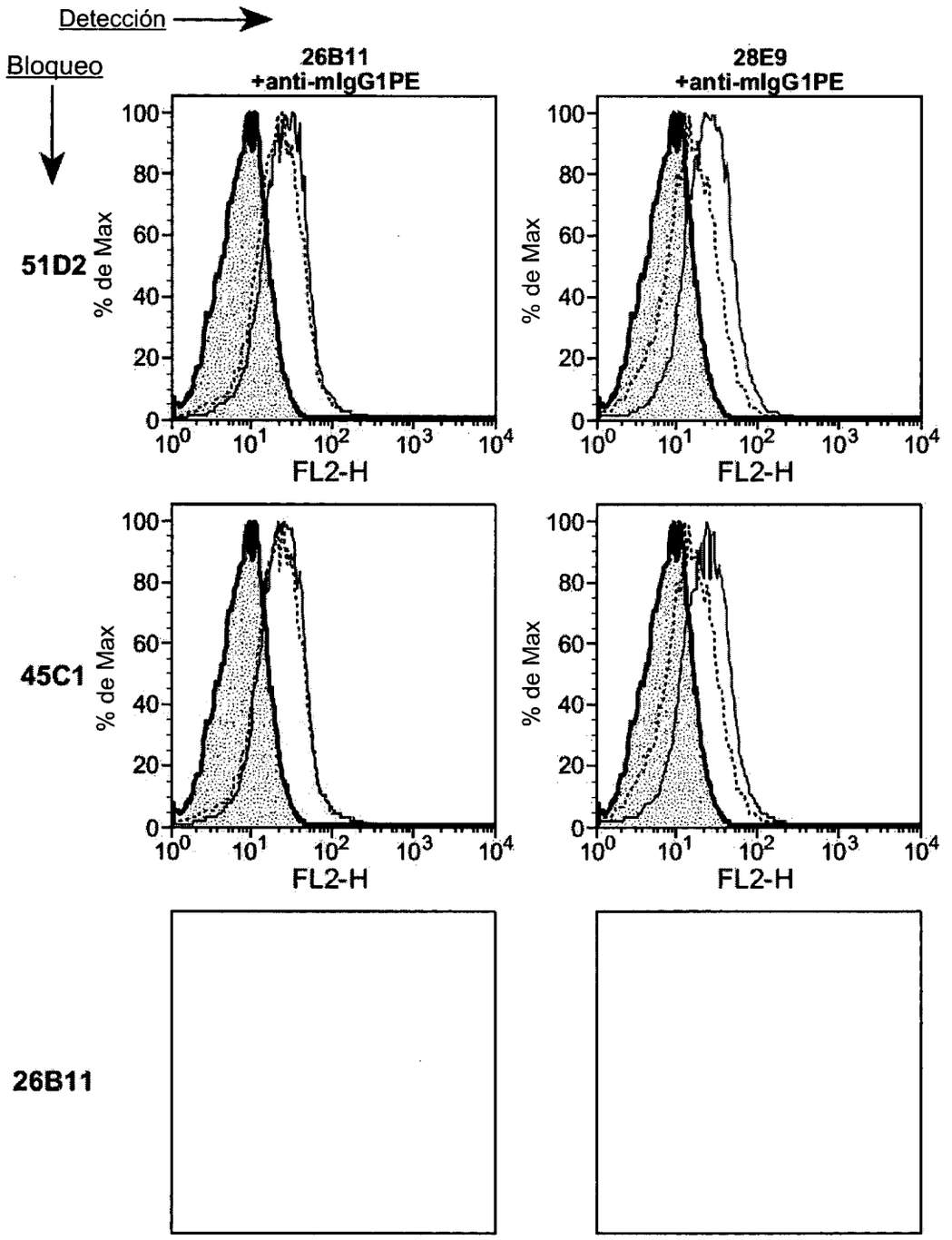

Detección
Bloqueo
26B11
+anti-mIgG1PE
28E9
+anti-mIgG1PE
51D2
45C1
26B11
% de Max
FL2-H
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4

FIG. 4A-15

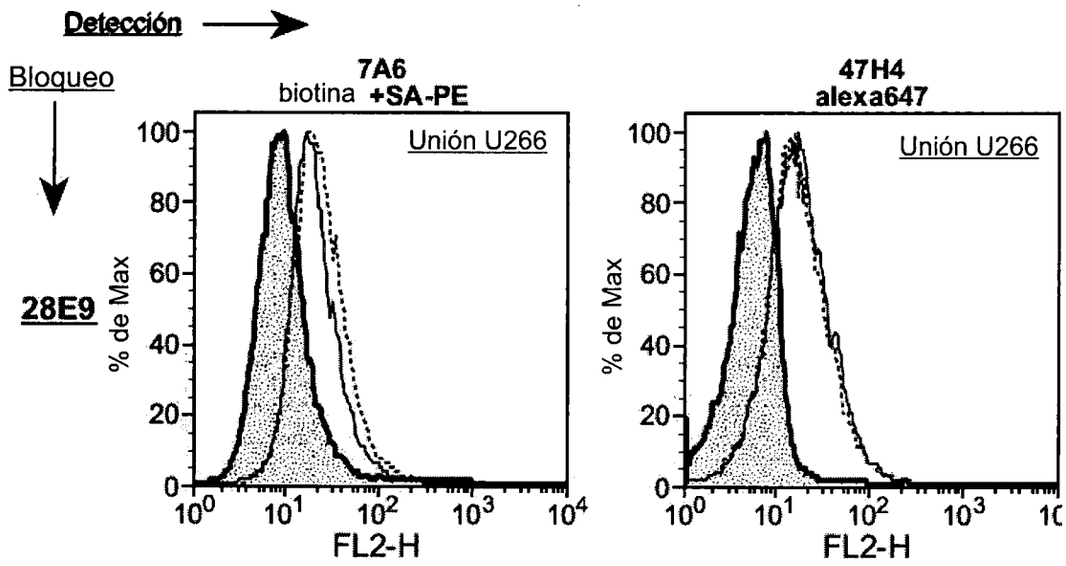

Detección
Bloqueo
28E9
7A6
biotina +SA-PE
Unión U266
% de Max
FL2-H
47H4
alexa647
Unión U266
% de Max
FL2-H

FIG. 4A-16

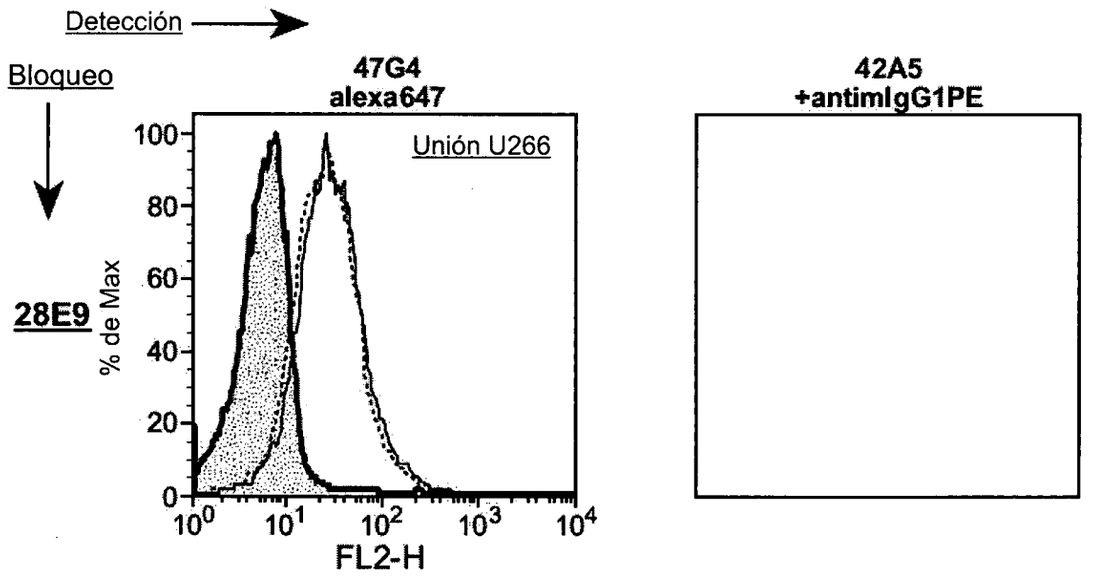

Detección
Bloqueo
28E9
47G4
alexa647
Unión U266
% de Max
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
42A5
+antimIgG1PE

FIG. 4A-17

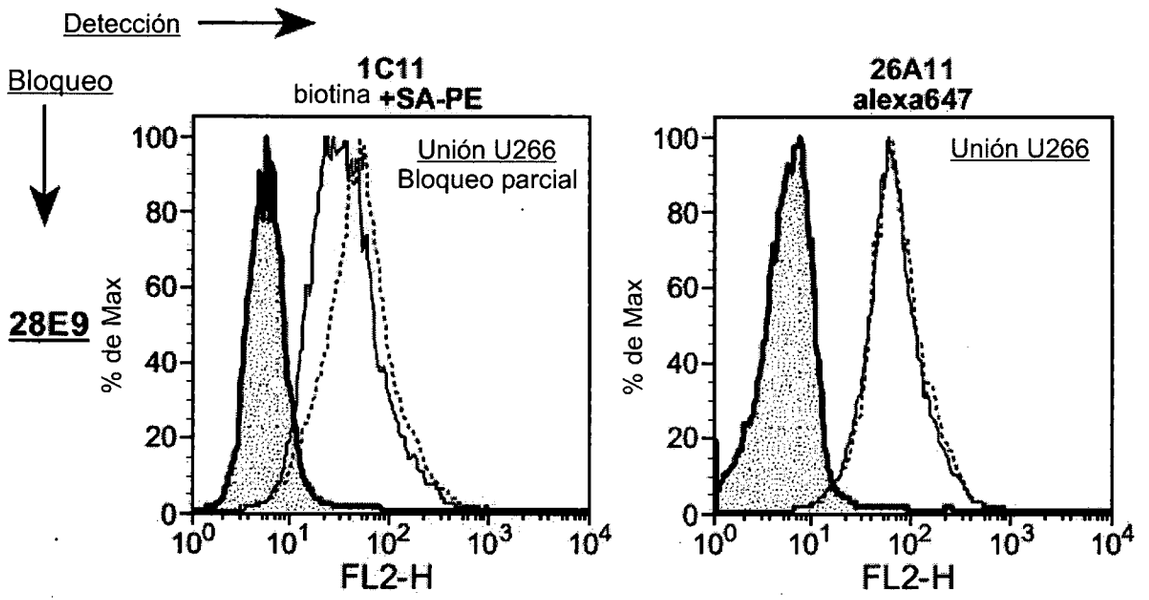

Detección
Bloqueo
28E9
1C11
biotina +SA-PE
Unión U266
Bloqueo parcial
% de Max
FL2-H
26A11
alexa647
Unión U266
% de Max
FL2-H

FIG. 4A-18

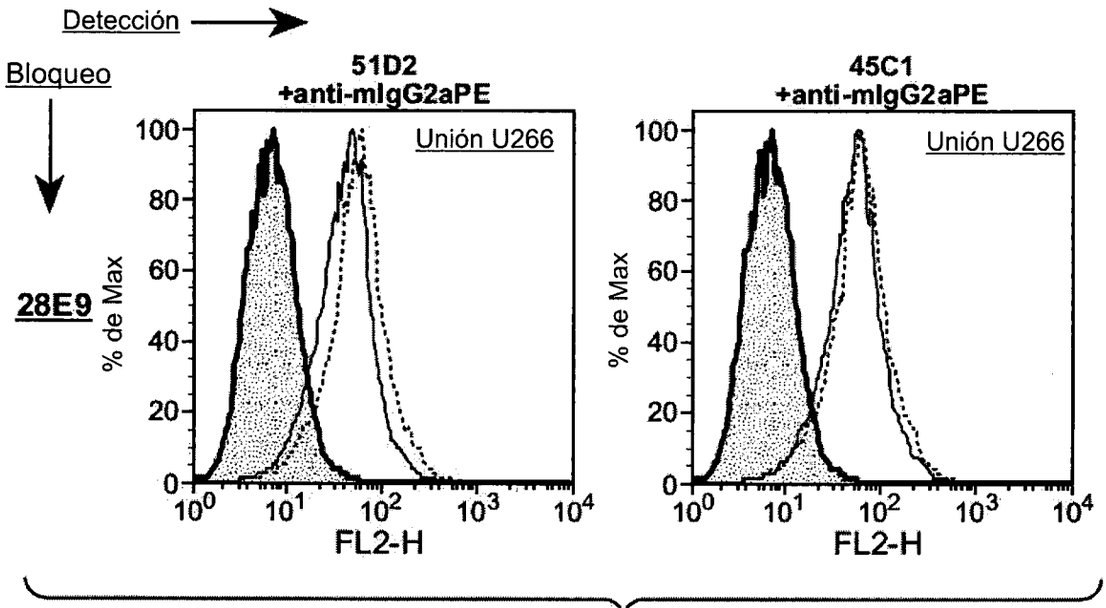

Detección
Bloqueo
28E9
51D2
+anti-mIgG2aPE
45C1
+anti-mIgG2aPE
Unión U266
Unión U266
% de Max
% de Max
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H
FL2-H

FIG. 4A-19

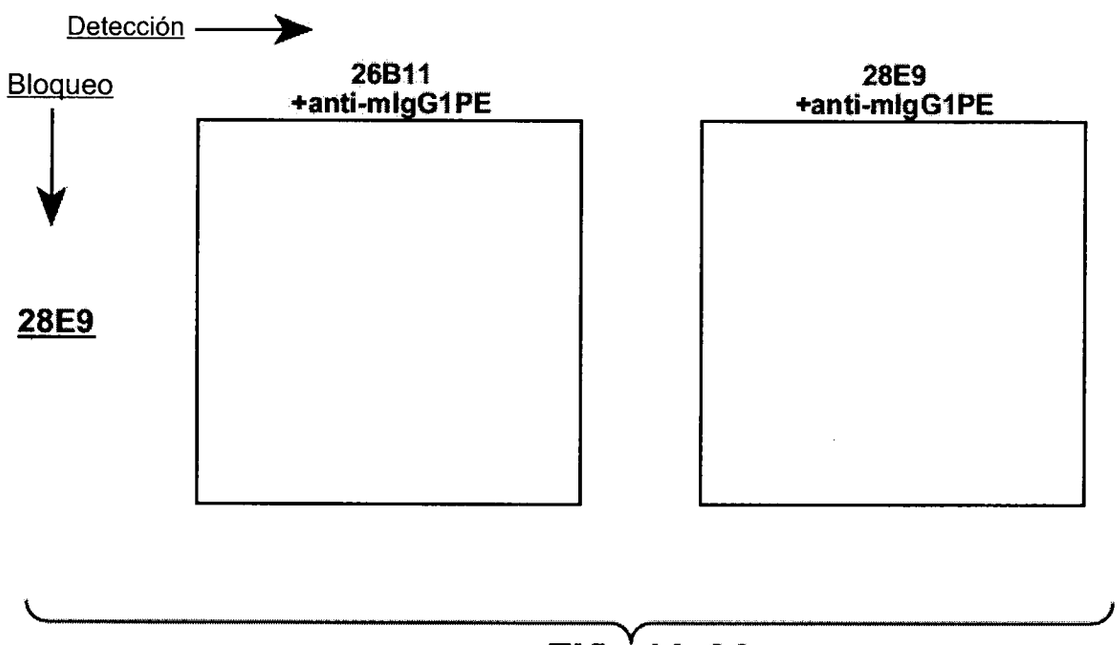

Detección
Bloqueo
26B11
+anti-mIgG1PE
28E9
+anti-mIgG1PE
28E9

FIG. 4A-20

Estudios de Unión /Bloqueo de Epítopo de anticuerpo Anti-M1'

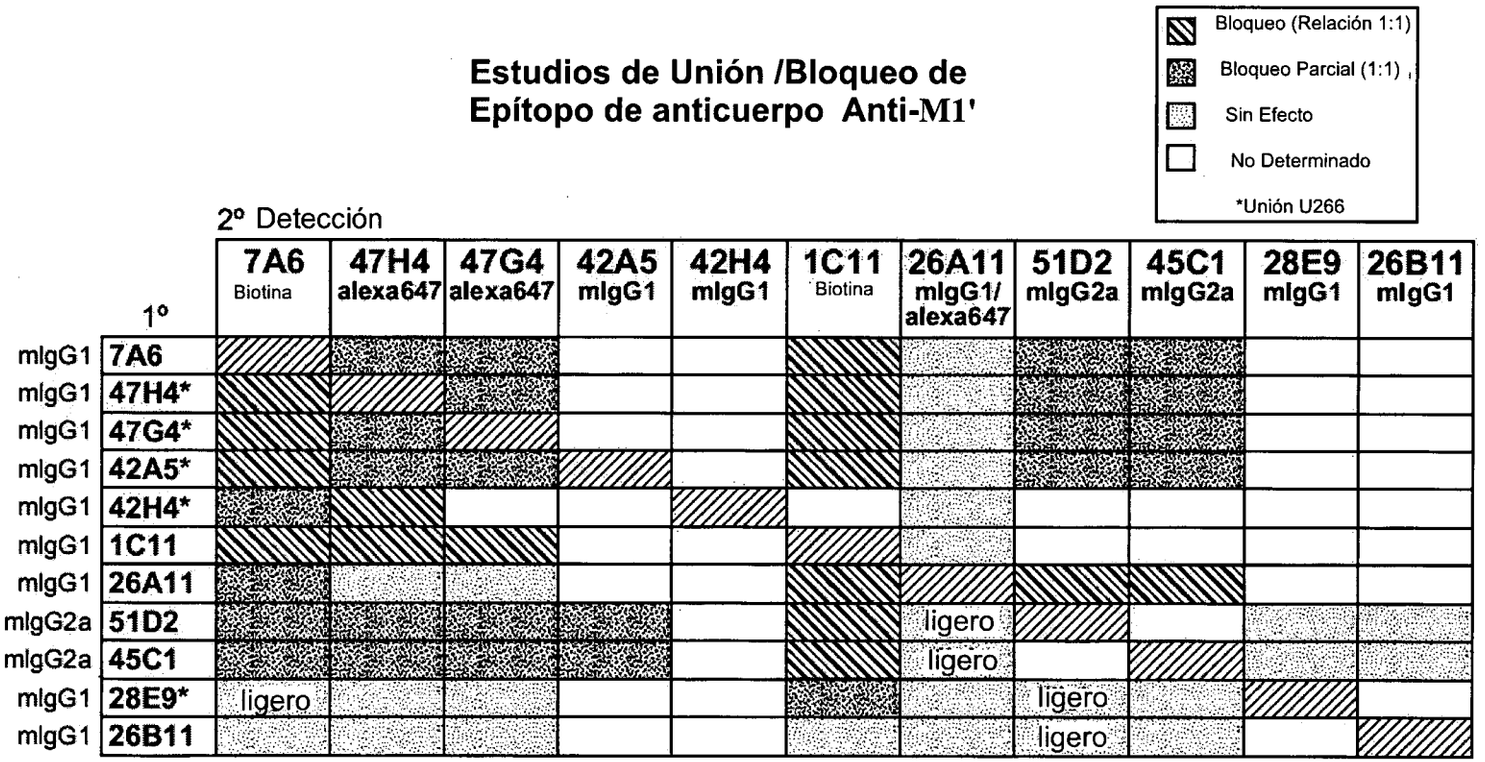


FIG. 4B

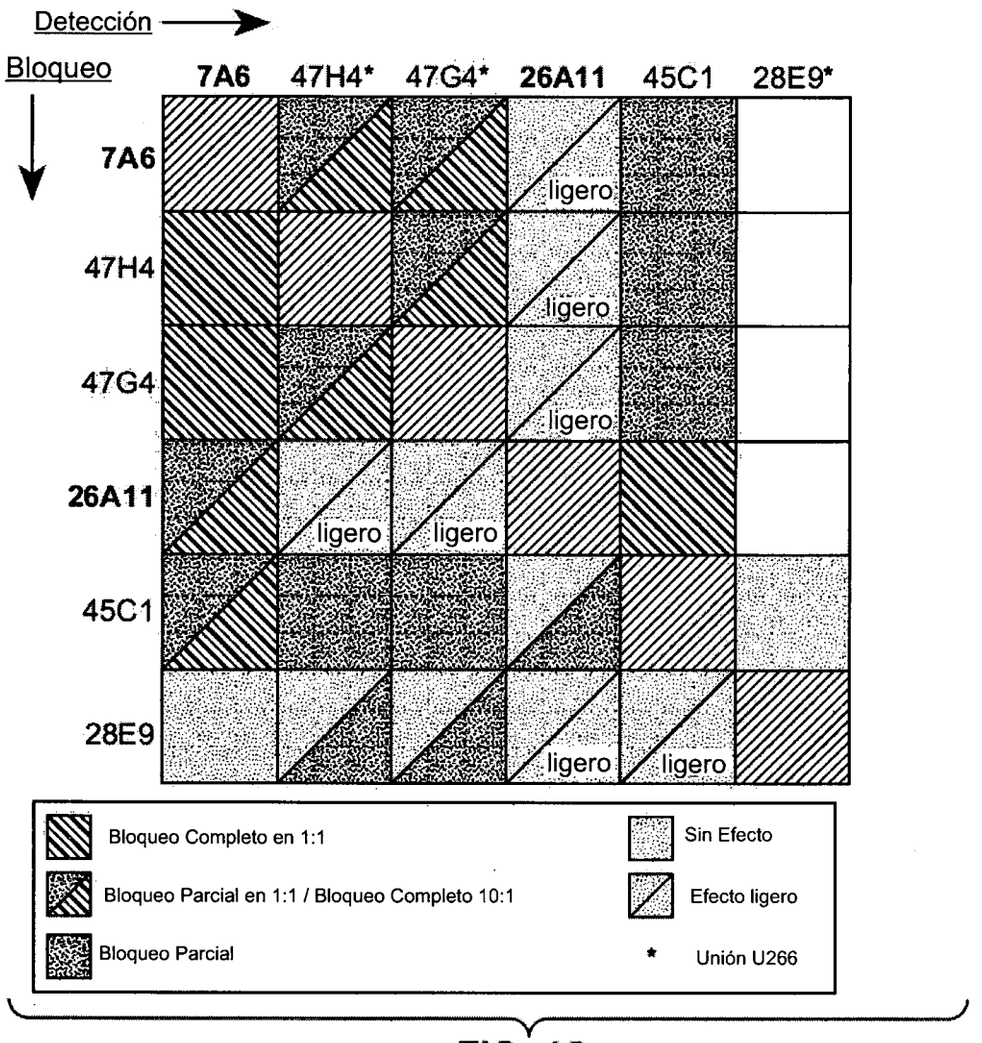

Detección
Bloqueo
7A6
47H4*
47G4*
26A11
45C1
28E9*
7A6
47H4
47G4
26A11
45C1
28E9
ligero
Bloqueo Completo en 1:1
Bloqueo Parcial en 1:1 / Bloqueo Completo 10:1
Bloqueo Parcial
Sin Efecto
Efecto ligero
* Unión U266

FIG. 4C

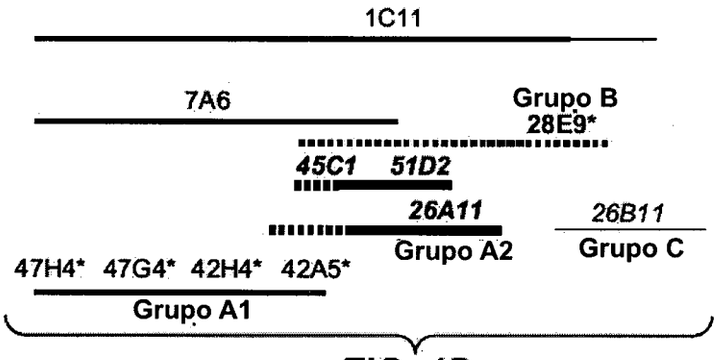

1C11
7A6
Grupo B
28E9*
45C1
51D2
26A11
26B11
Grupo A2
Grupo C
47H4*
47G4*
42H4*
42A5*
Grupo A1

FIG. 4D

Mapeo de Epítopos Anti-M1'

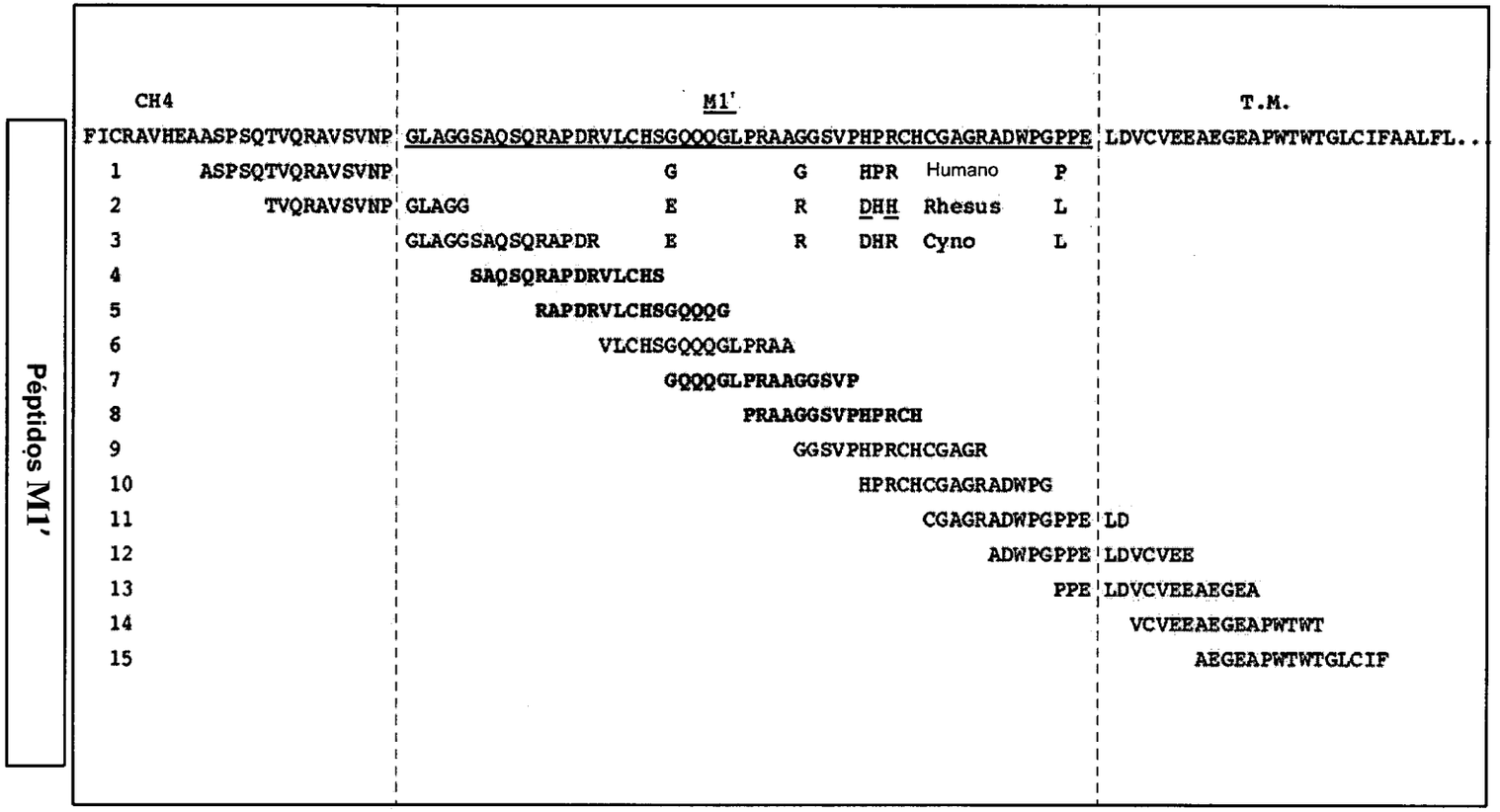


FIG. 5A

Mapeo de Epítopo Anti-IgE/M1'

	Péptido#	Secuencia de Péptido
47H4	4	SAQSQRAPDRVLCHS
7A6	4	SAQSQRAPDRVLCHS
	5	RAPDRVLCHSGQQQG
26A11	7	GQQQGLPRAAGGSVP
	8	PRAAGGSVPHPRCH

FIG. 5B

Mapeo de Epítopo Anti-IgE/M1'

	Péptido#	Secuencia de Péptido
47H4 v5	4	SAQSQRAPDRVLCHS
7A6 v1	4	SAQSQRAPDRVLCHS
	5	RAPDRVLCHSGQQQG
26A11 v6	7	GQQQGLPRAAGGSVP
	8	PRAAGGSVPHPRCH

FIG. 5C

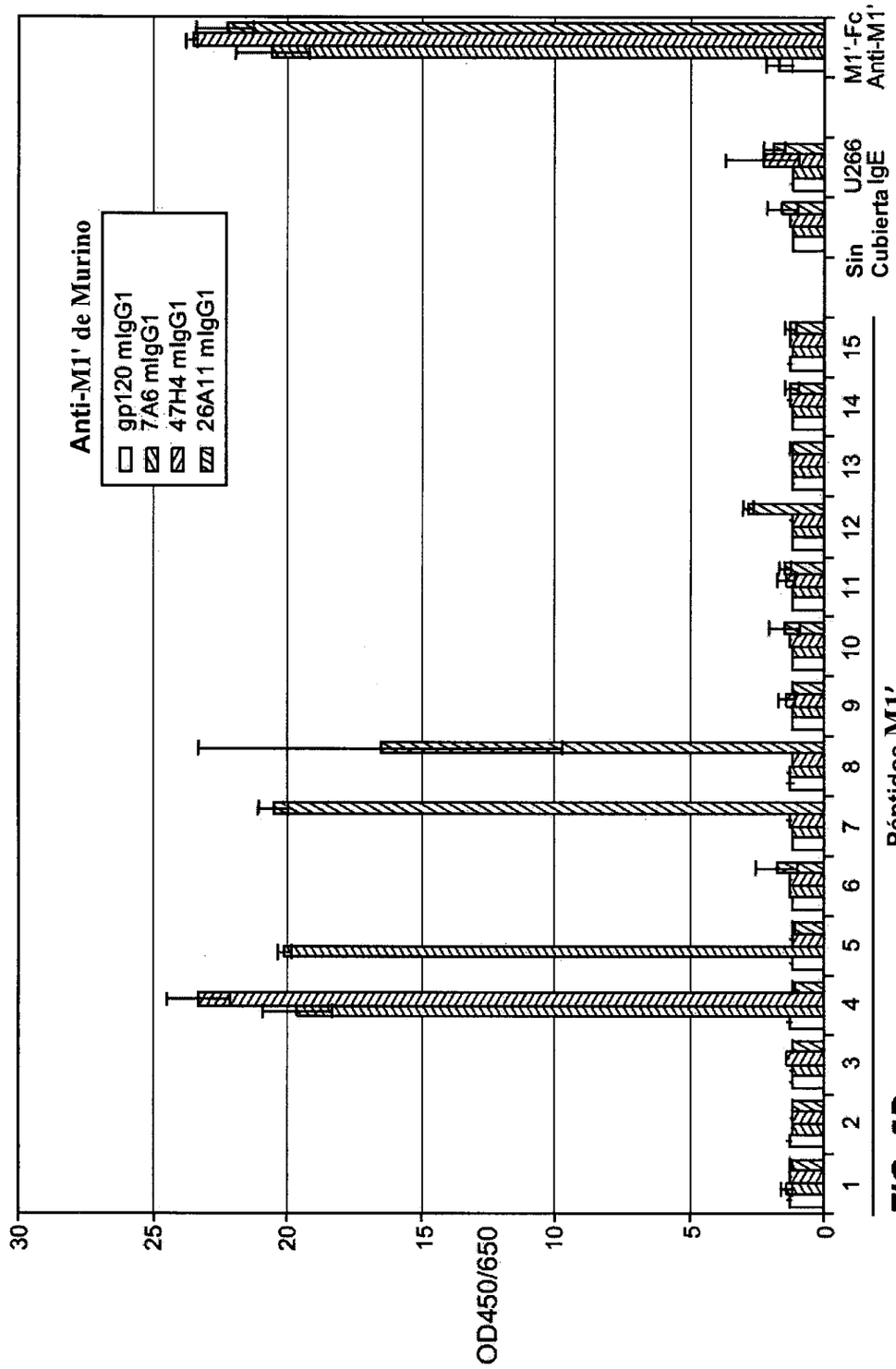

Anti-M1' de Murino
gp120 mIgG1
7A6 mIgG1
47H4 mIgG1
26A11 mIgG1
OD450/650
0
5
10
15
20
25
30
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Péptidos M1'
Sin Cubierta
U266 IgE
M1'-Fc Anti-M1'

FIG. 5D

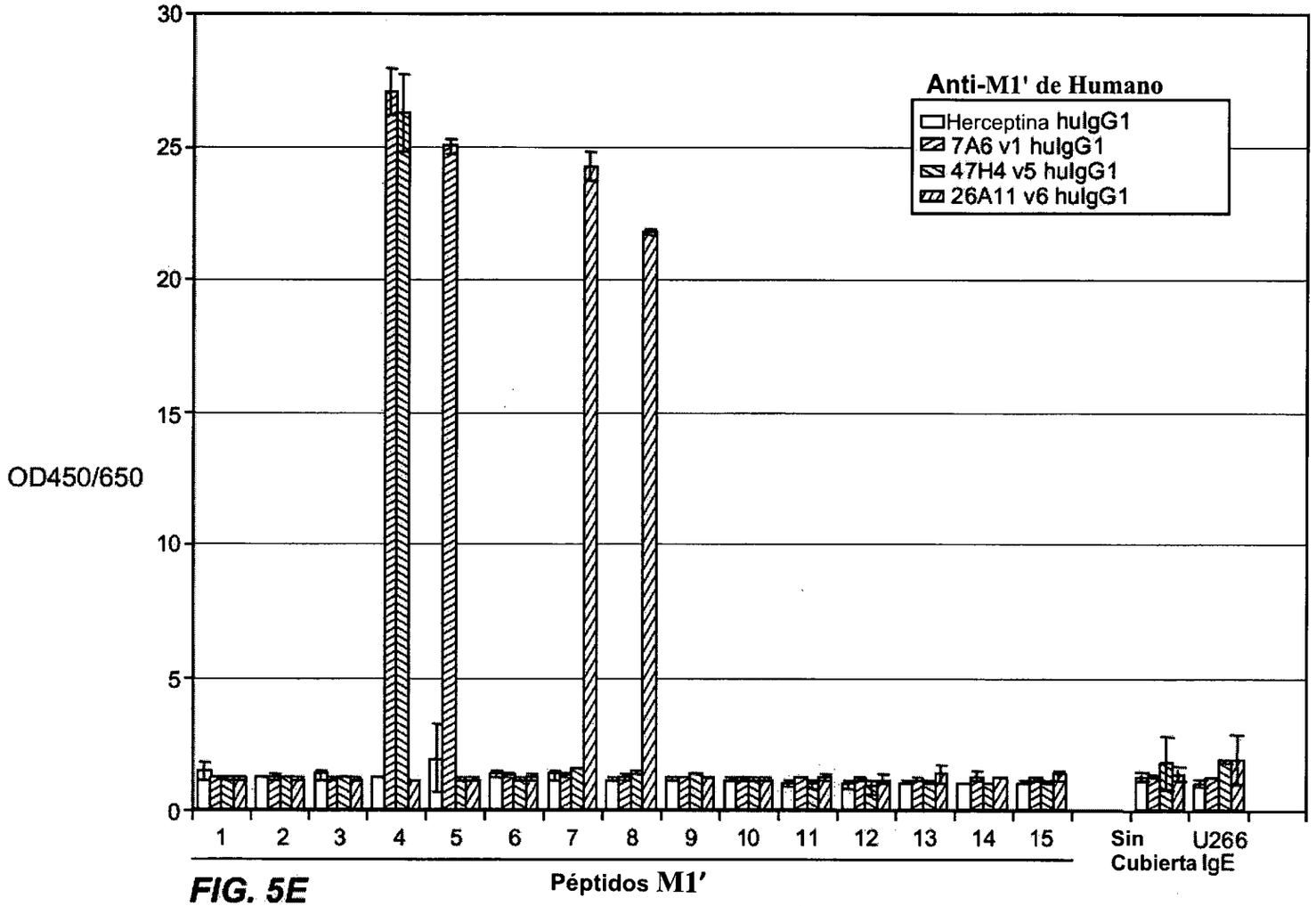

Anti-M1' de Humano
Herceptina hulgG1
7A6 v1 hulgG1
47H4 v5 hulgG1
26A11 v6 hulgG1
OD450/650
30
25
20
15
10
5
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
Sin Cubierta
U266 IgE
Péptidos M1'

FIG. 5E

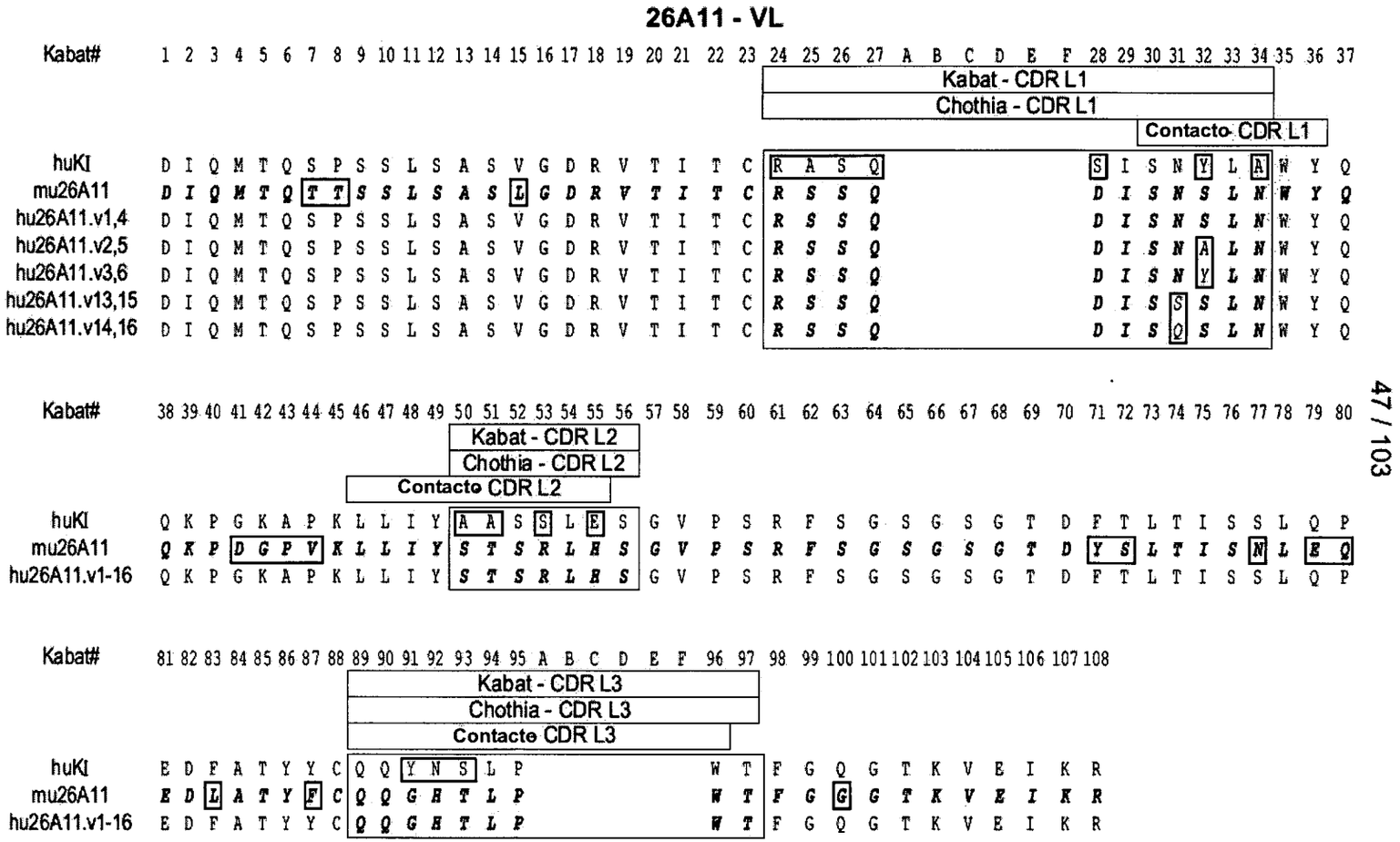

26A11 - VL
Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto CDR L1
huKI D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q
mu26A11 D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I T C R S S Q D I S N S L N W Y Q
hu26A11.v1,4 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q D I S N S L N W Y Q
hu26A11.v2,5 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q D I S N A L N W Y Q
hu26A11.v3,6 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q D I S N Y L N W Y Q
hu26A11.v13,15 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q D I S S S L N W Y Q
hu26A11.v14,16 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q D I S Q S L N W Y Q
Kabat# 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto CDR L2
huKI Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
mu26A11 Q K P D G P V K L L I Y S T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E Q
hu26A11.v1-16 Q K P G K A P K L L I Y S T S R L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
Kabat# 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto CDR L3
huKI E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R
mu26A11 E D L A T Y F C Q Q G H T L P W T F G G G T K V E I K R
hu26A11.v1-16 E D F A T Y Y C Q Q G H T L P W T F G Q G T K V E I K R

FIG. 6A

HOJA MODIFICADA

7A6 - VL

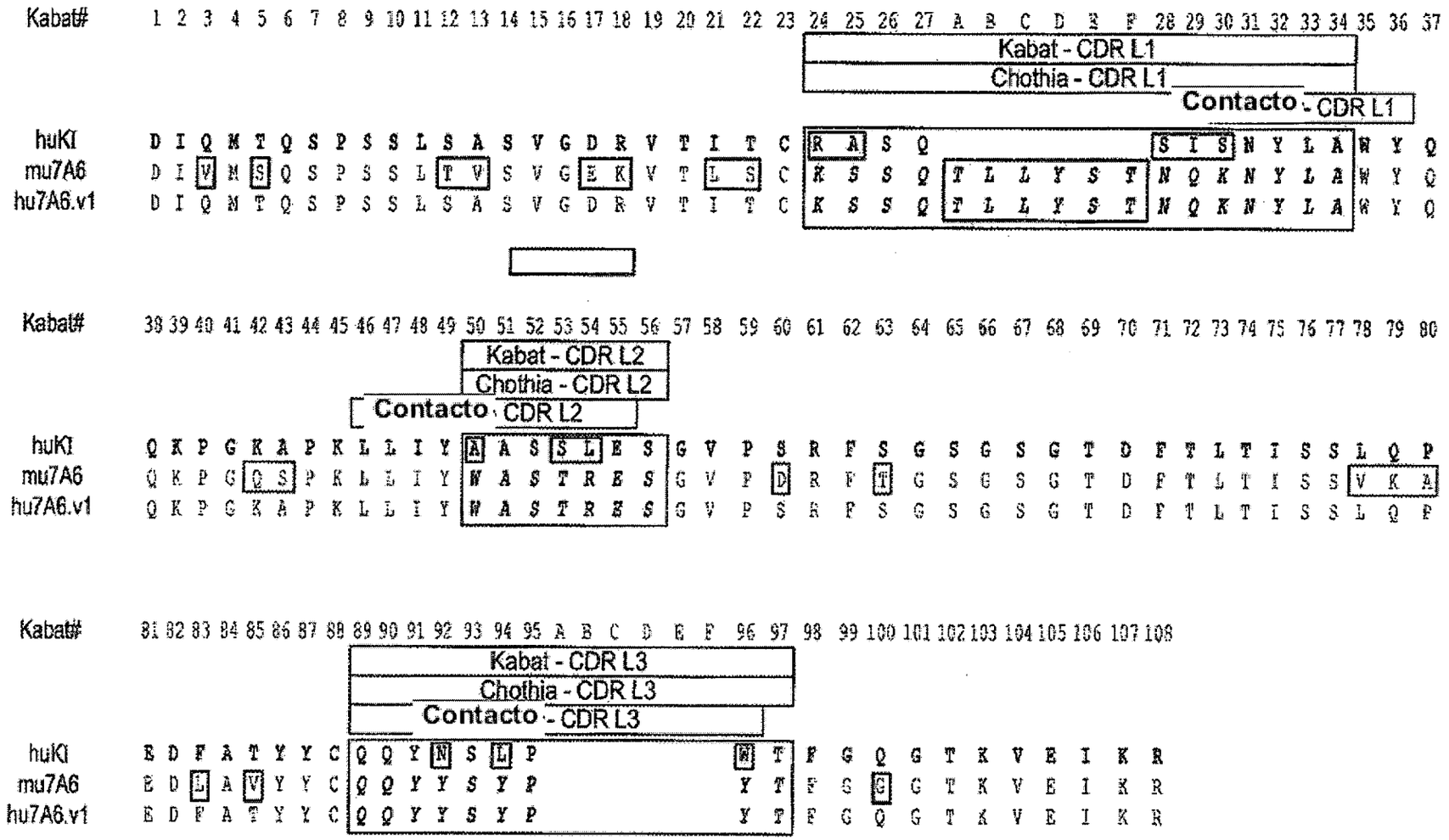


FIG. 6B

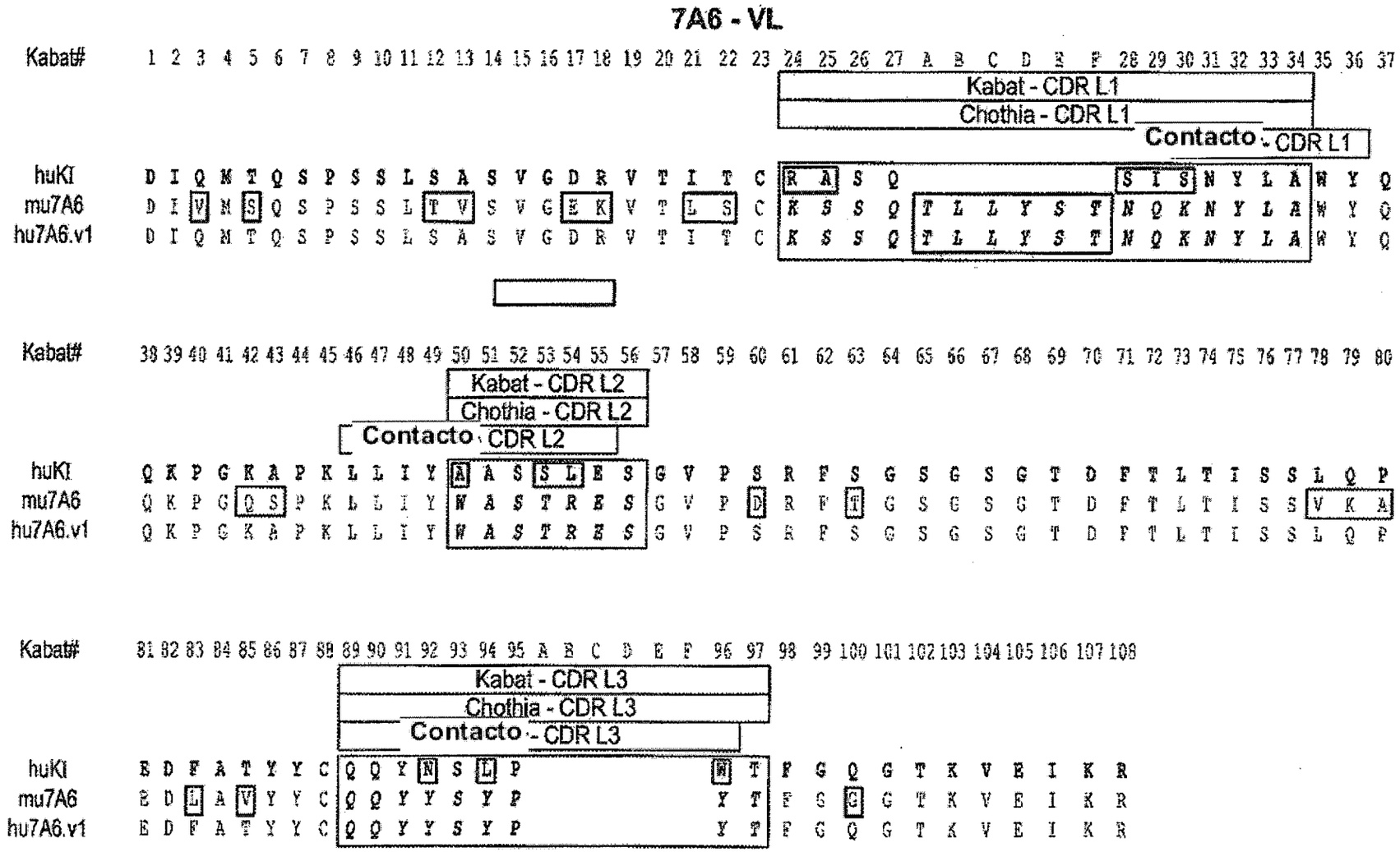

7A6 - VL
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contacto - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contacto - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contacto - CDR L3
huKI
mu7A6
hu7A6.v1

FIG. 6B

47H4 - VL

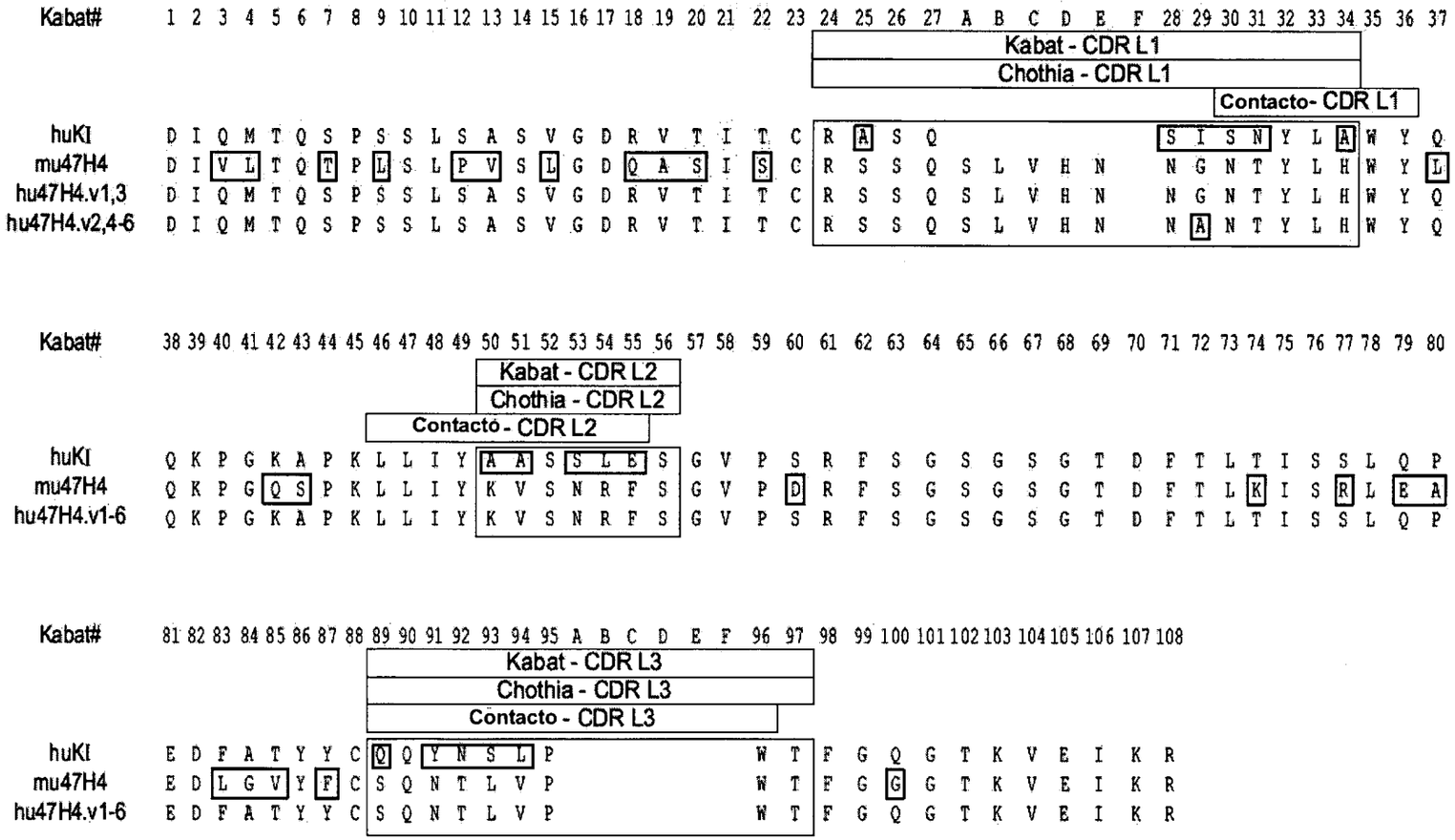
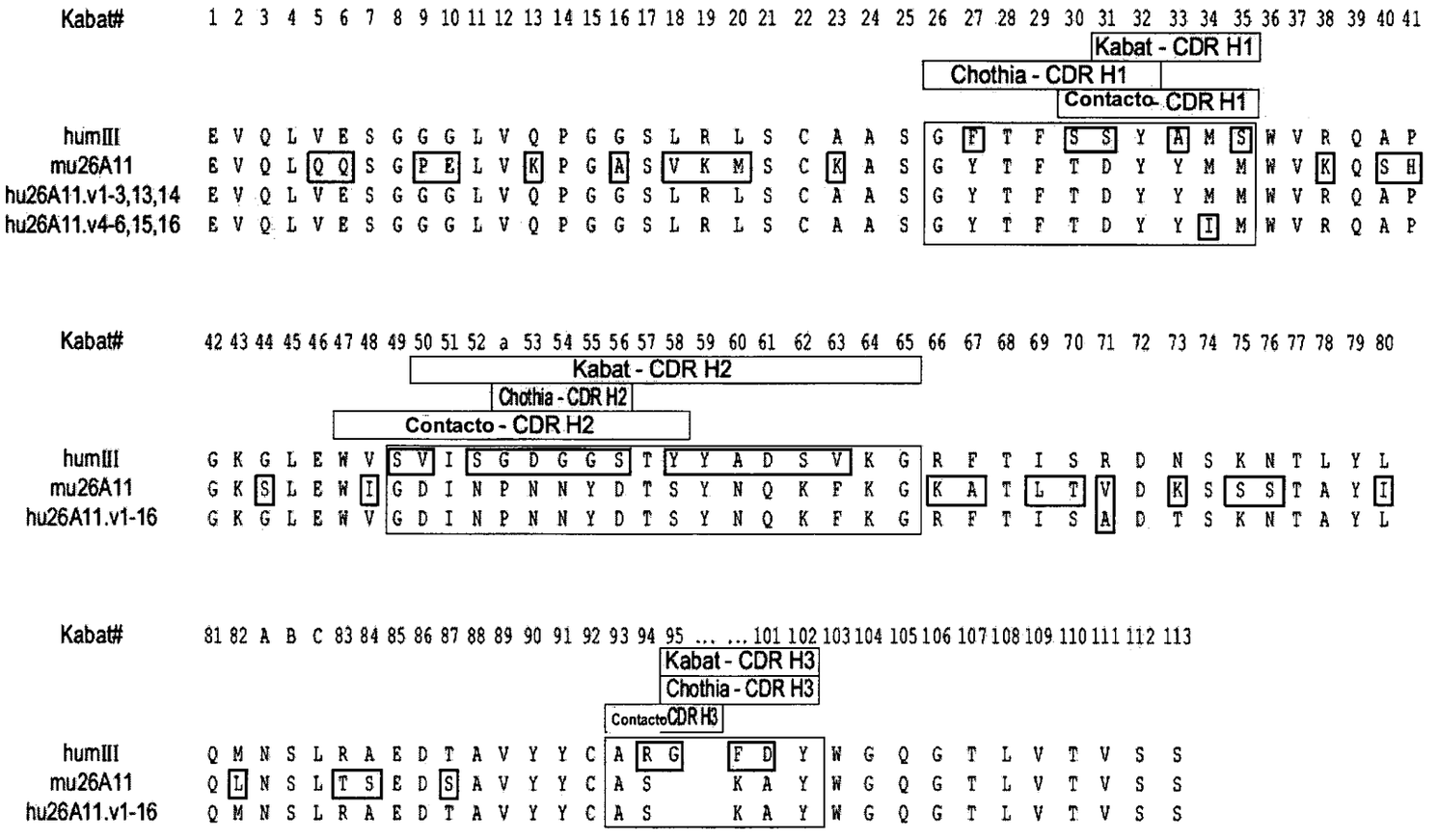


FIG. 6C

26A11 - VH



Contacto

FIG. 6D

HOJA MODIFICADA

7A6 - VH

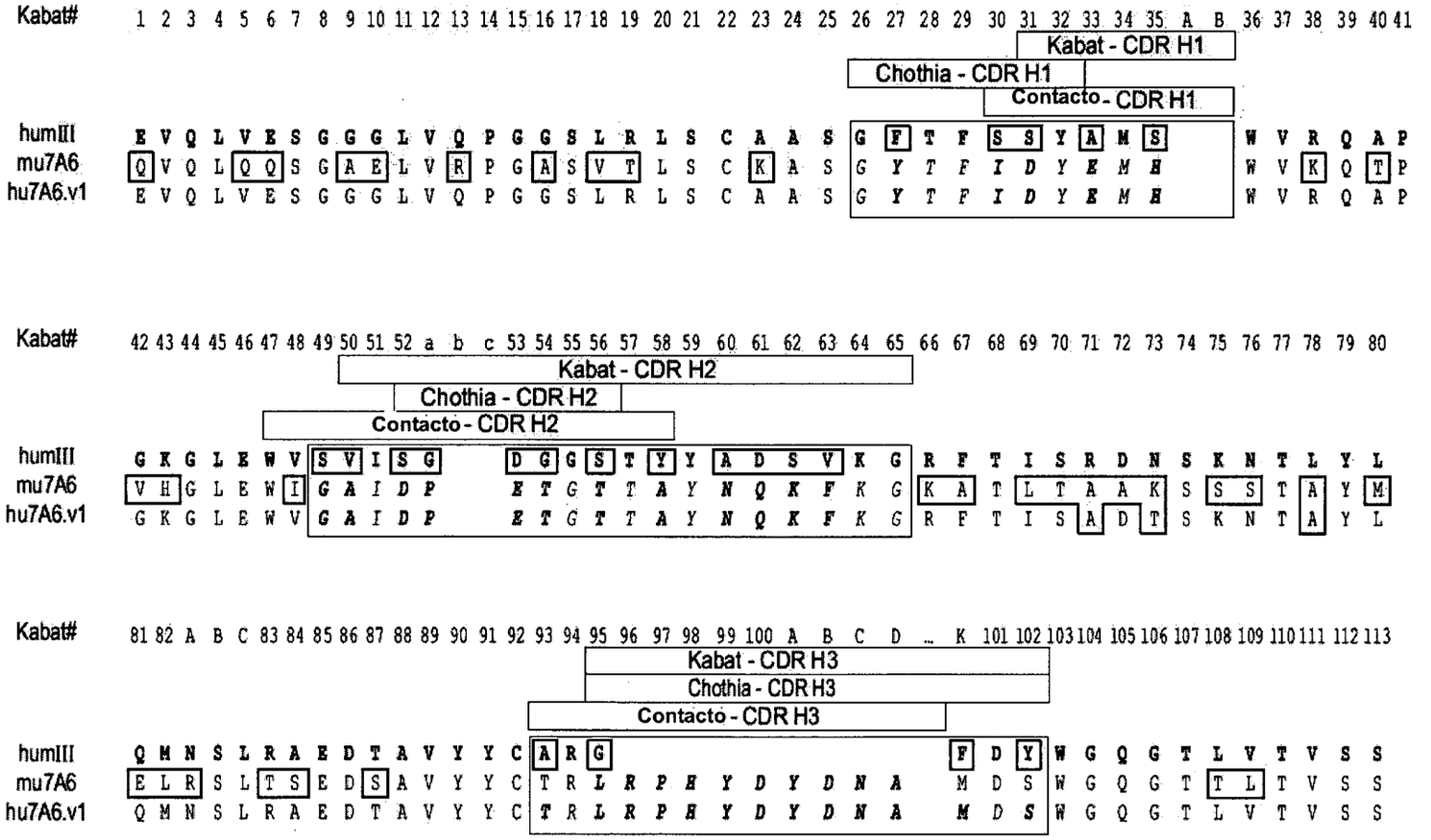


FIG. 6E

7A6 - VH

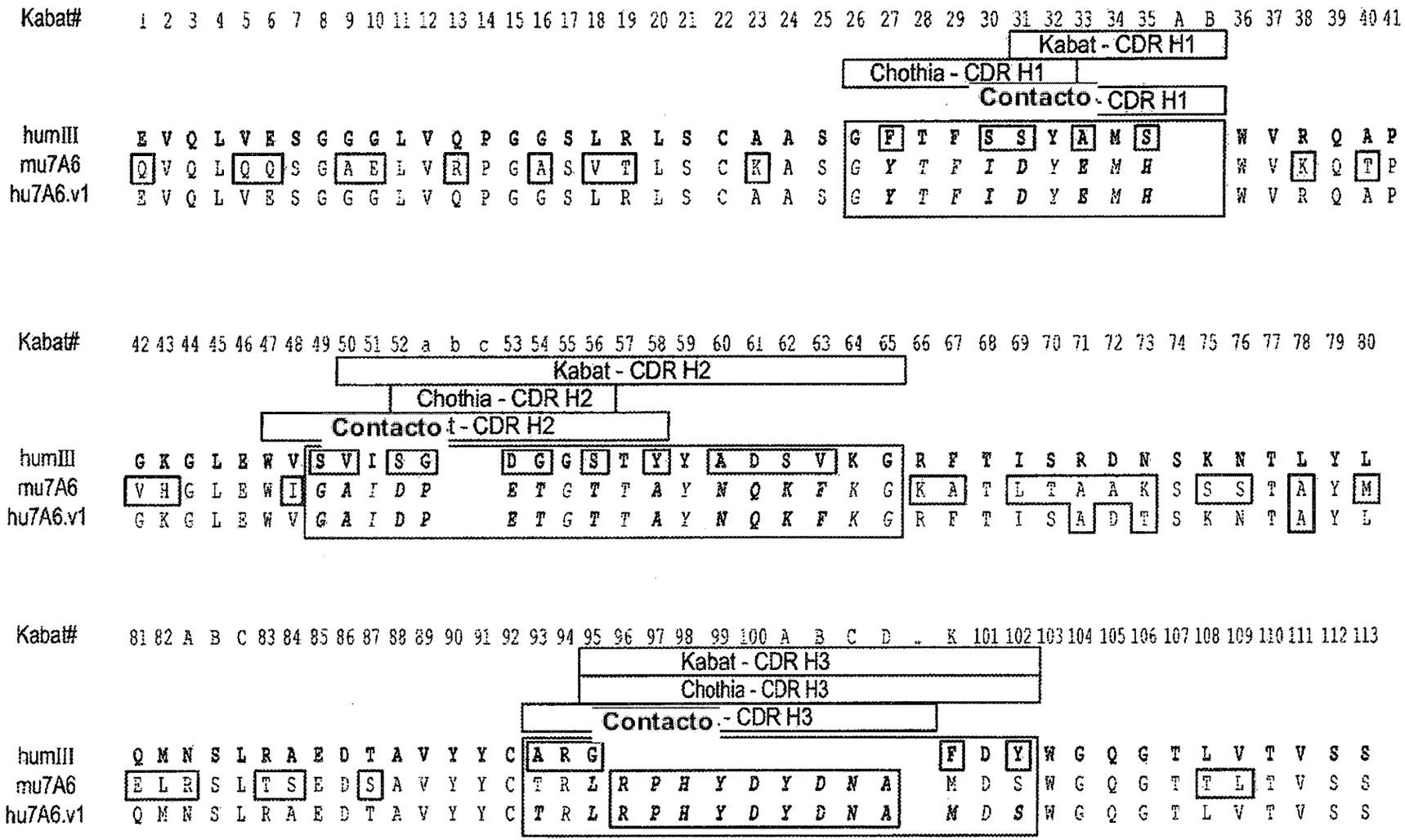

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contacto - CDR H1
humIII E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P
mu7A6 Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T F I D Y E M H W V K Q T P
hu7A6.v1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F I D Y E M H W V R Q A P
Kabat#
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contacto t - CDR H2
humIII G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
mu7A6 V H G L E W I G A I D P E T G T T A Y N Q K F K G K A T L T A A K S S S T A Y M
hu7A6.v1 G K G L E W V G A I D P E T G T T A Y N Q K F K G R F T I S A D T S K N T A Y L
Kabat#
81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D . K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contacto - CDR H3
humIII Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S
mu7A6 E L R S L T S E D S A V Y Y C T R L R P H Y D Y D N A M D S W G Q G T T L T V S S
hu7A6.v1 Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R L R P H Y D Y D N A M D S W G Q G T L V T V S S

FIG. 6E

HOJA MODIFICADA

47H4 - VH

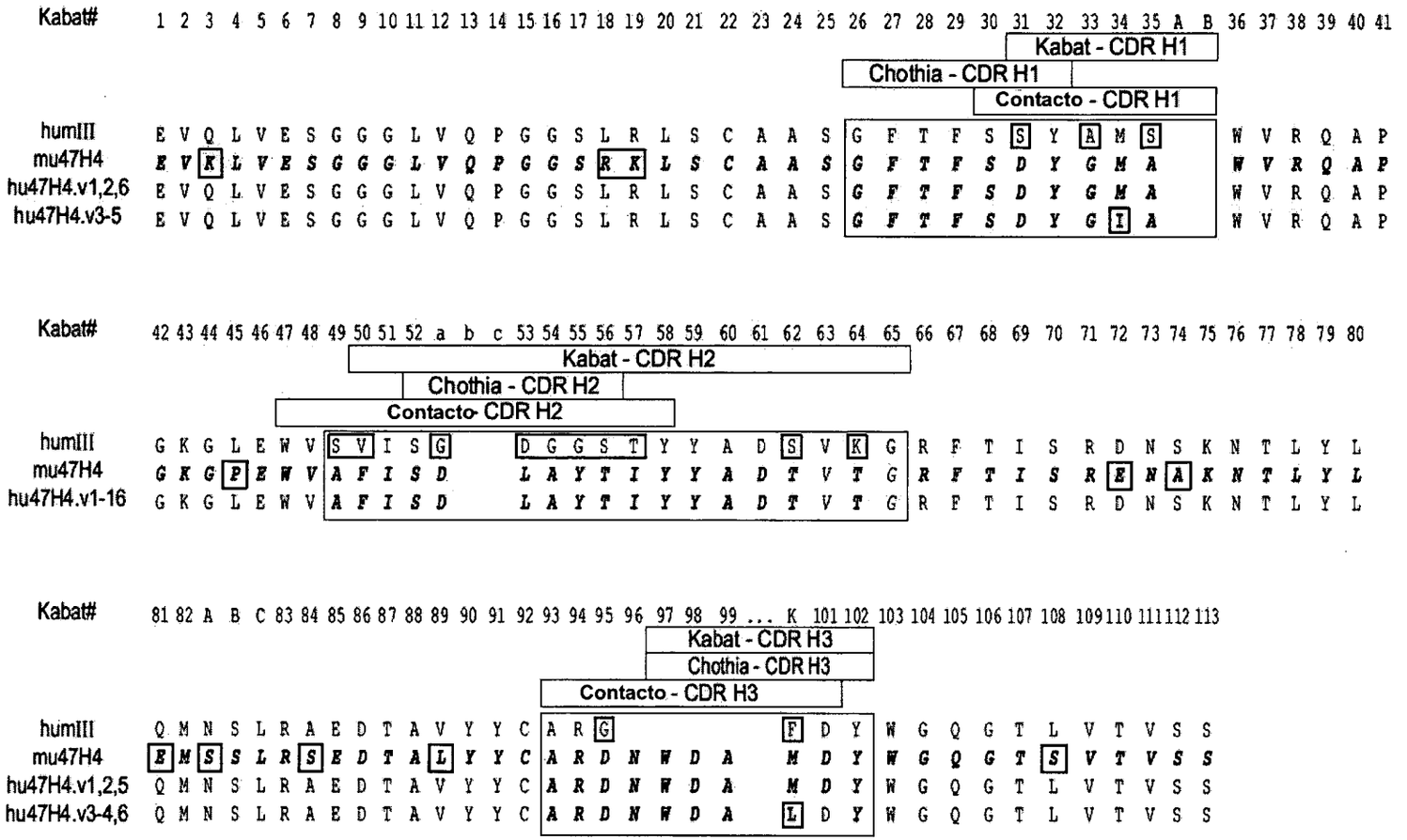


FIG. 6F

47H4 - VH

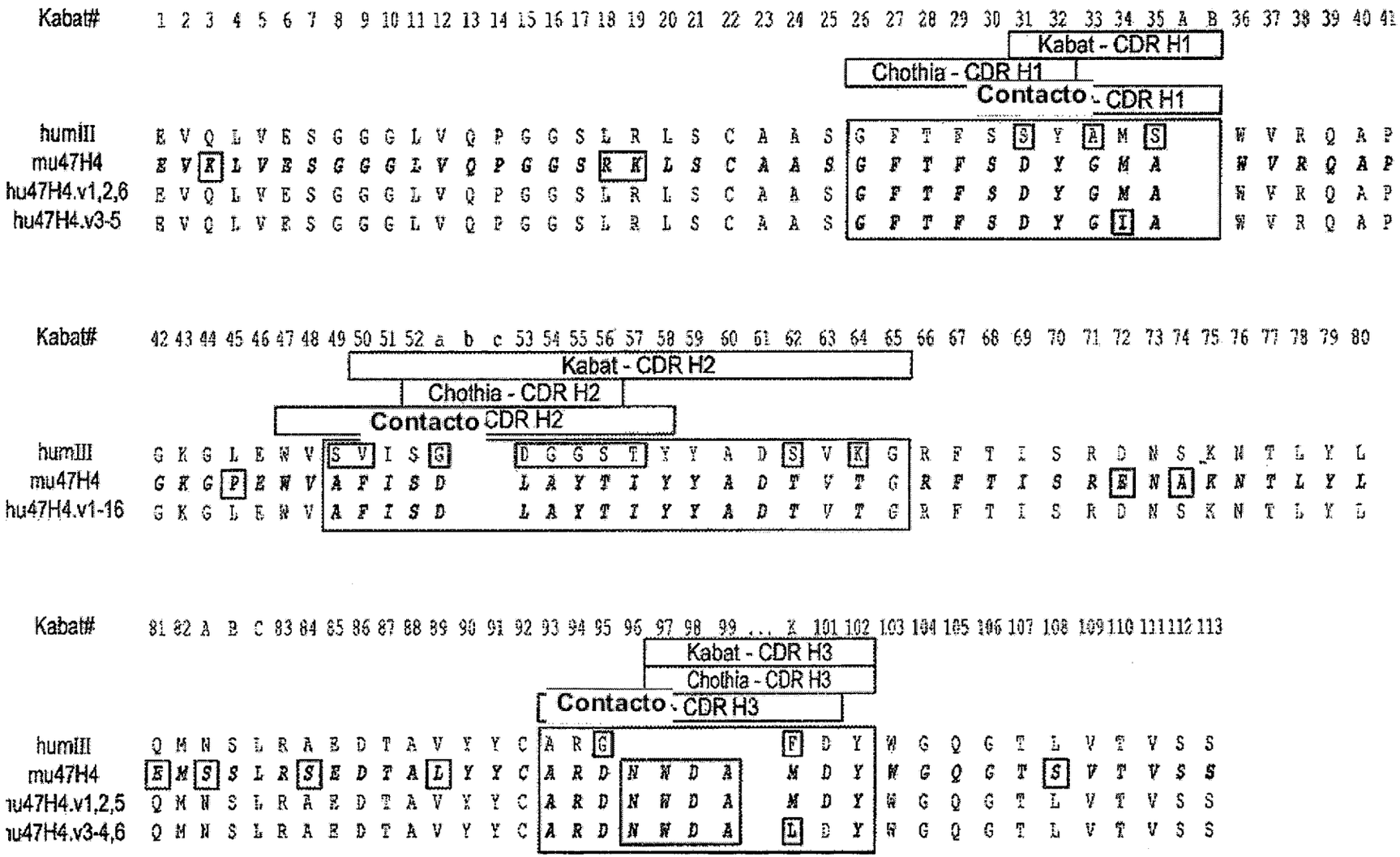


FIG. 6F

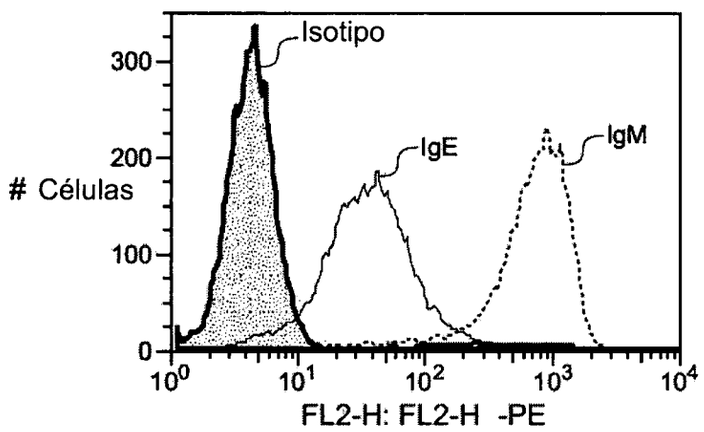

Isotipo
IgE
IgM
300
200
100
0
Células
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
FL2-H: FL2-H -PE

FIG. 7A

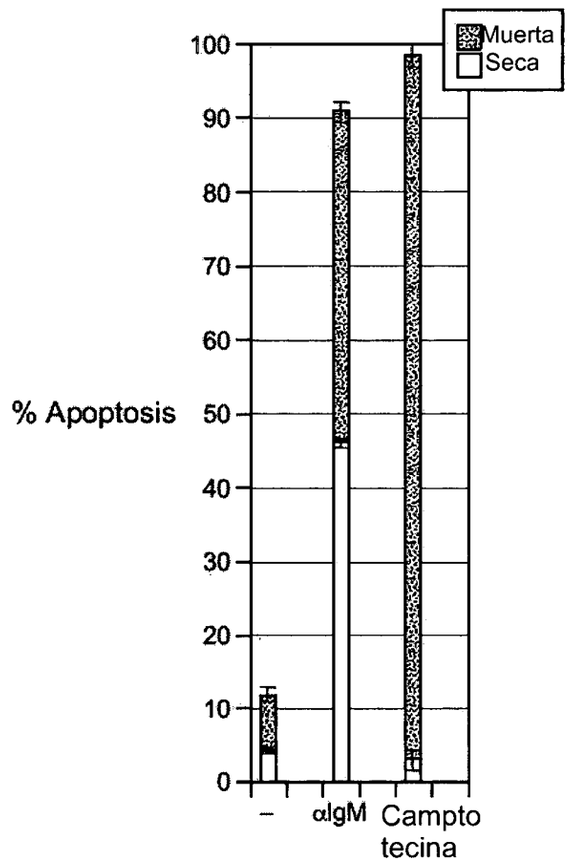

Muerta
Seca
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Apoptosis
–
αIgM
Campto
tecina

FIG. 7C

Ensayo de Apoptosis IgE/M1' Daudi

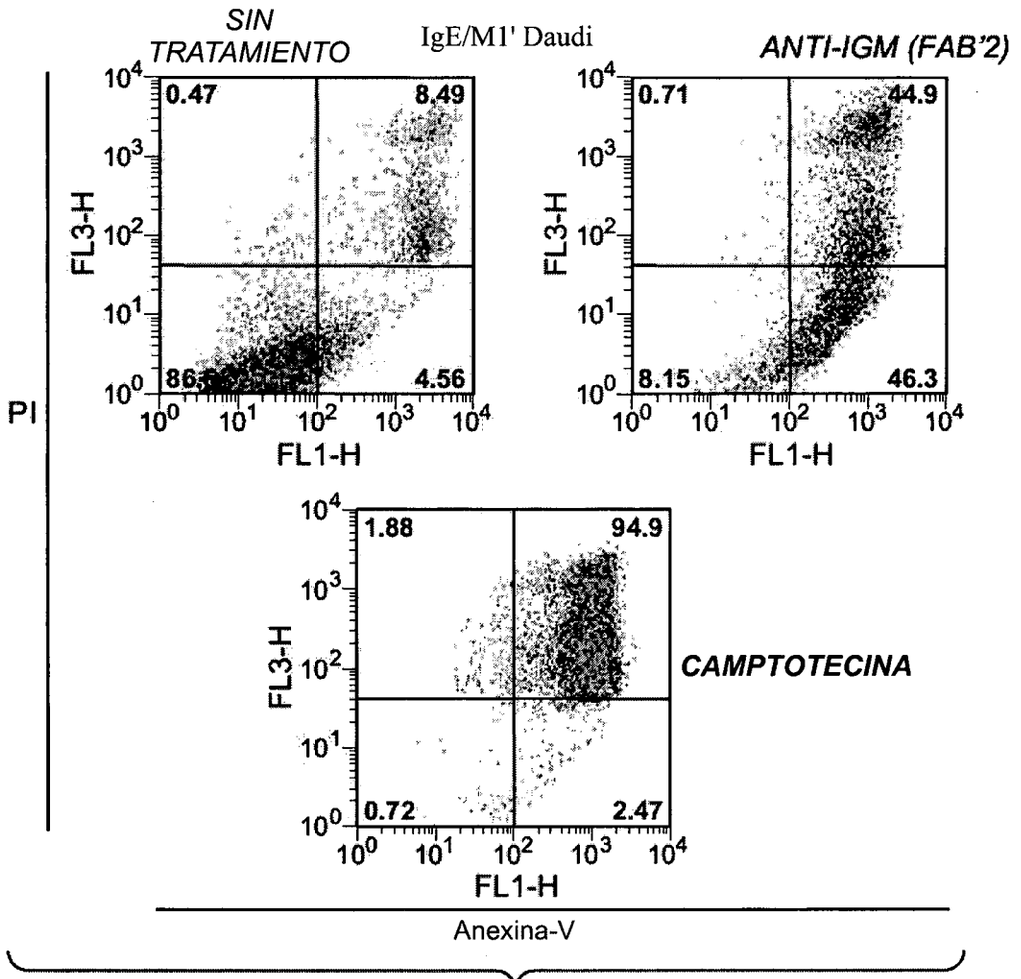


FIG. 7B

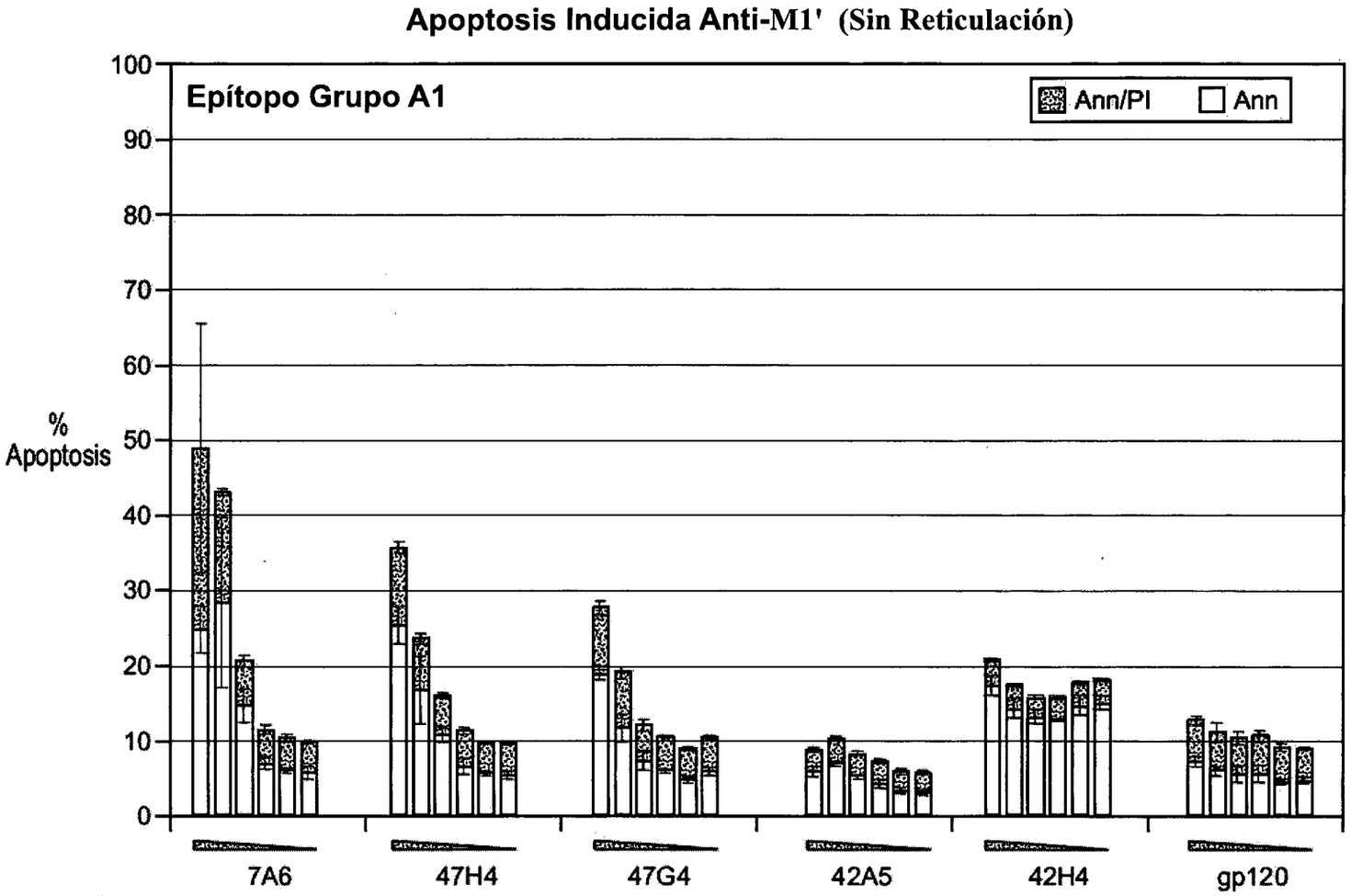

Apoptosis Inducida Anti-M1' (Sin Reticulación)
Epítopo Grupo A1
Ann/PI
Ann
% Apoptosis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
7A6
47H4
47G4
42A5
42H4
gp120

FIG. 7D

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda.

22

09-118682

Tomo

2/2

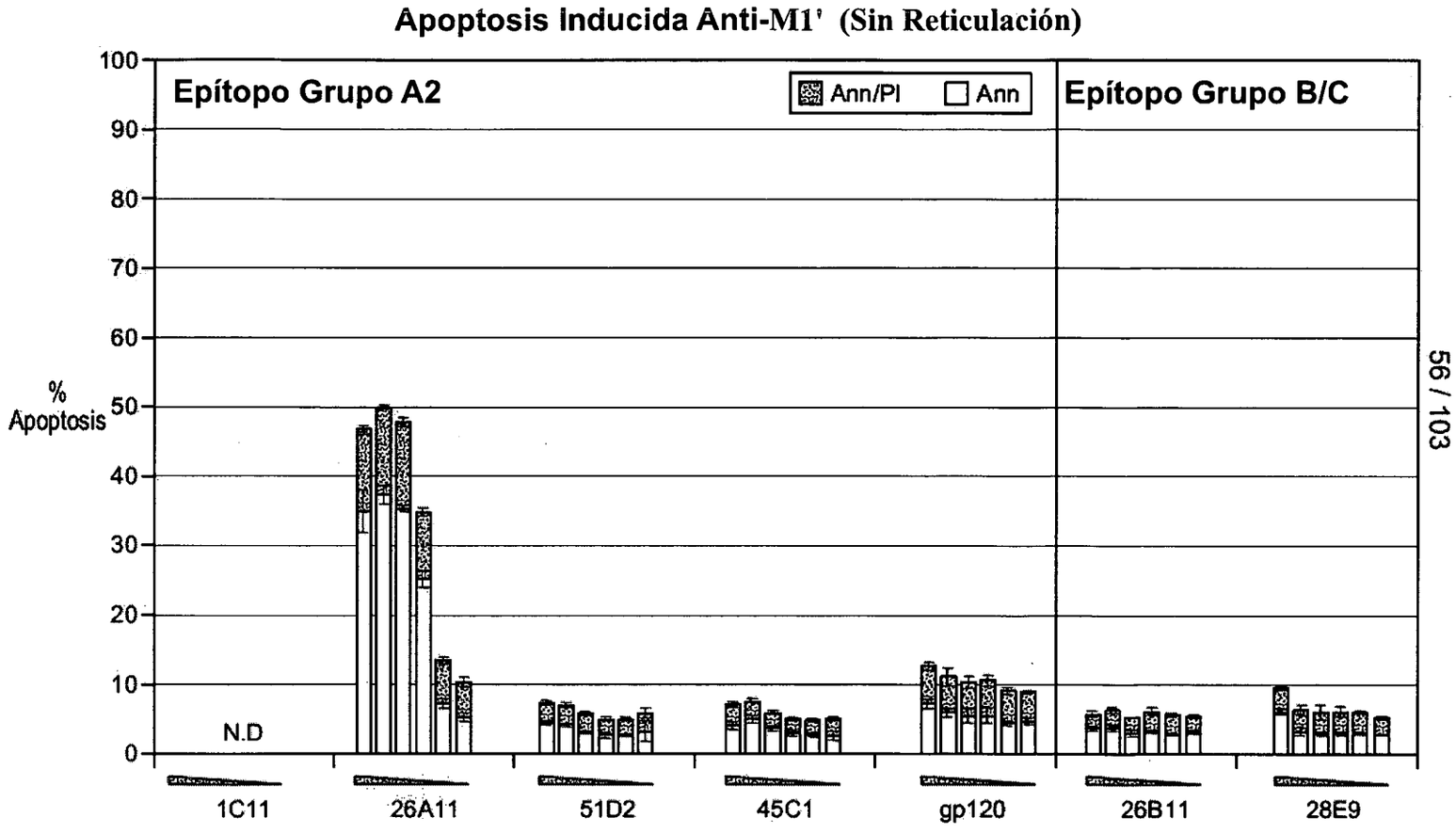

Apoptosis Inducida Anti-M1' (Sin Reticulación)
Epítopo Grupo A2
Ann/PI
Ann
Epítopo Grupo B/C
% Apoptosis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N.D
1C11
26A11
51D2
45C1
gp120
26B11
28E9

FIG. 7E

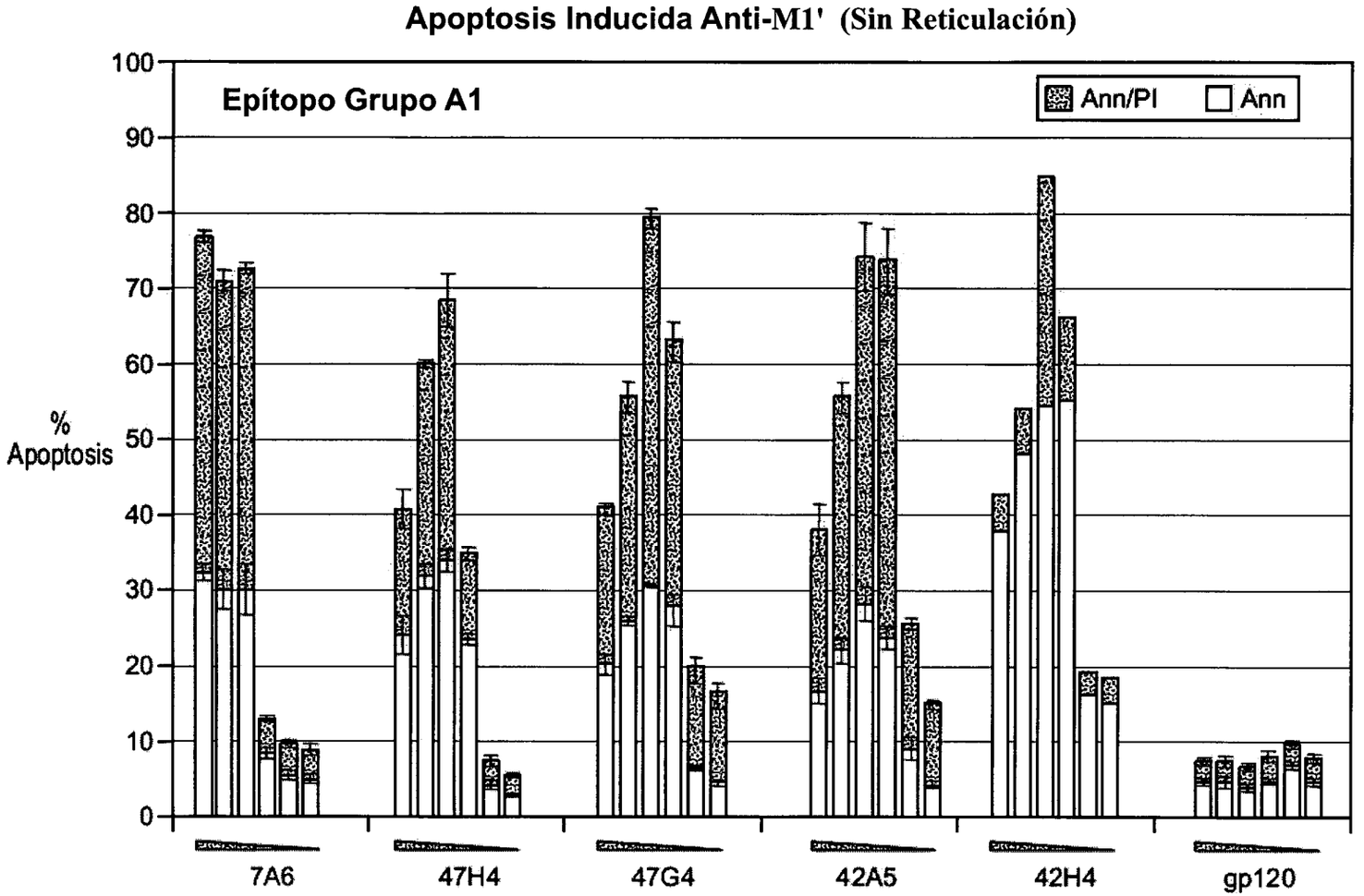

Apoptosis Inducida Anti-M1' (Sin Reticulación)
Epítopo Grupo A1
Ann/PI
Ann
% Apoptosis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
7A6
47H4
47G4
42A5
42H4
gp120

FIG. 7F

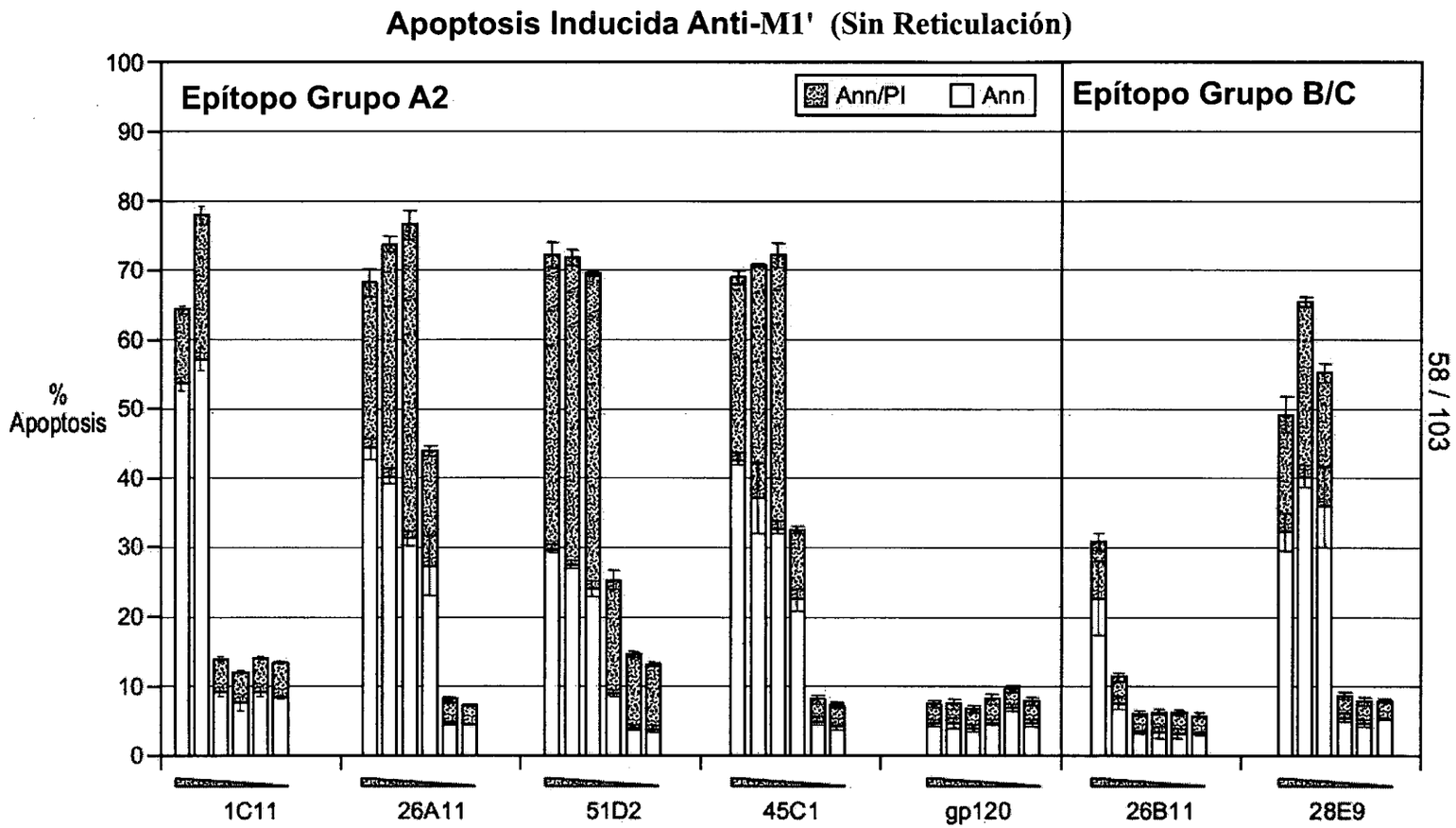

Apoptosis Inducida Anti-M1' (Sin Reticulación)
Epítopo Grupo A2
Ann/PI
Ann
Epítopo Grupo B/C
% Apoptosis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1C11
26A11
51D2
45C1
gp120
26B11
28E9

FIG. 7G

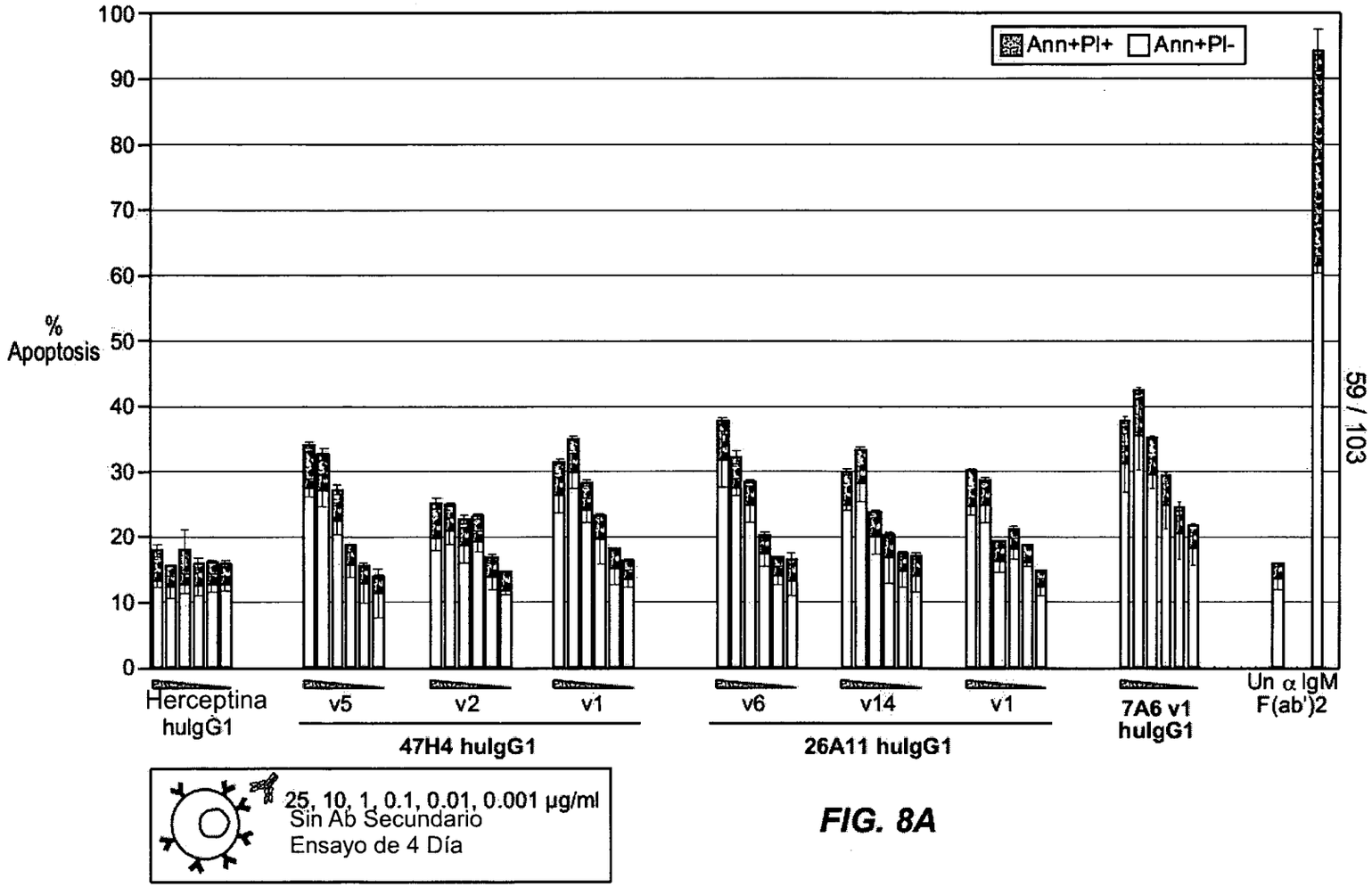

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Apoptosis
Ann+PI+
Ann+PI-
59 / 103
Herceptina hulgG1
v5
v2
v1
v6
v14
v1
7A6 v1 hulgG1
Un α IgM F(ab')2
47H4 hulgG1
26A11 hulgG1
25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 µg/ml
Sin Ab Secundario
Ensayo de 4 Día

FIG. 8A

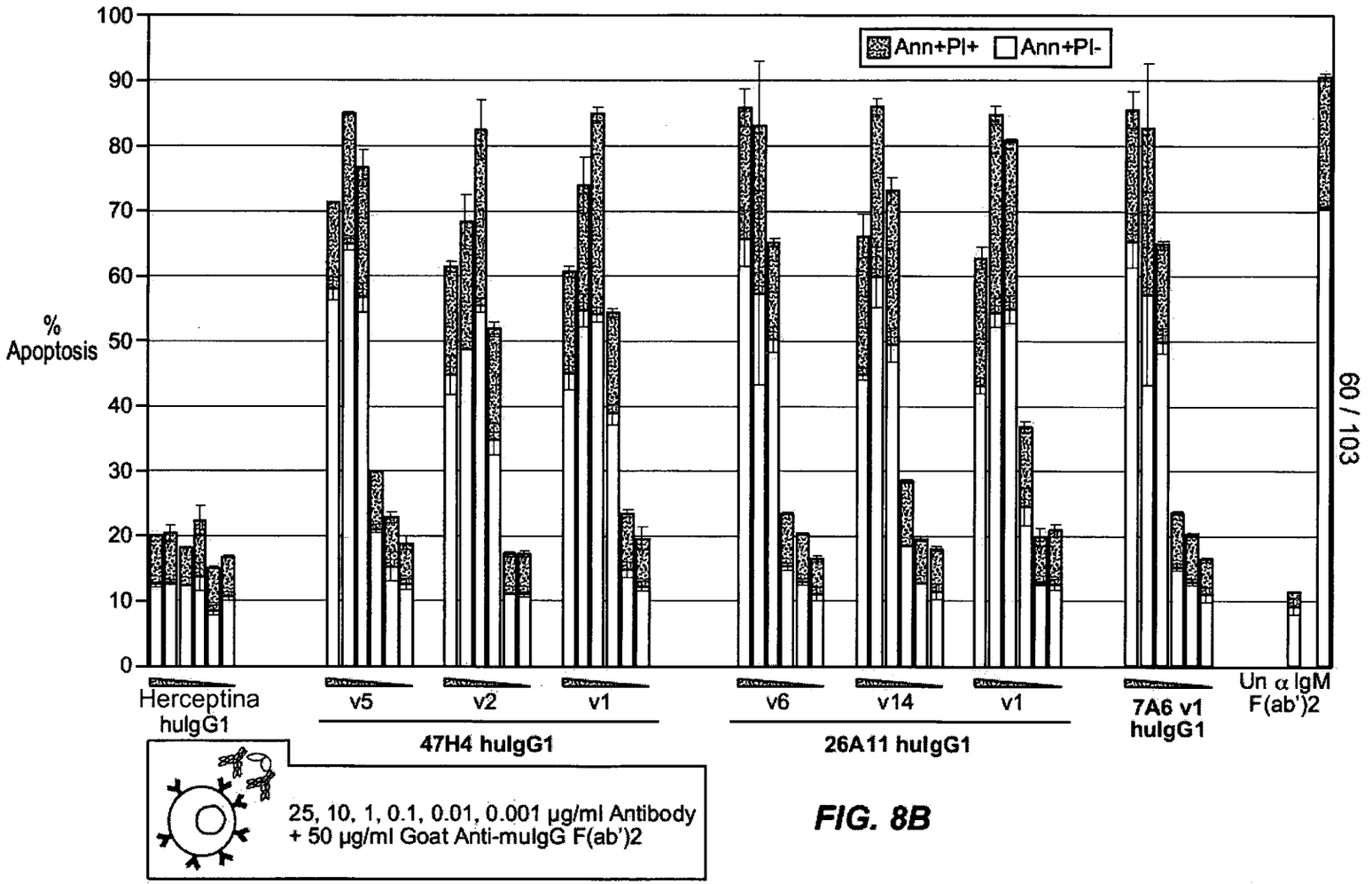

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% Apoptosis
Ann+PI+
Ann+PI-
60 / 103
Herceptina huIgG1
v5
v2
v1
v6
v14
v1
7A6 v1 huIgG1
Un α IgM F(ab')2
47H4 huIgG1
26A11 huIgG1
25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 µg/ml Antibody
+ 50 µg/ml Goat Anti-muIgG F(ab')2

FIG. 8B

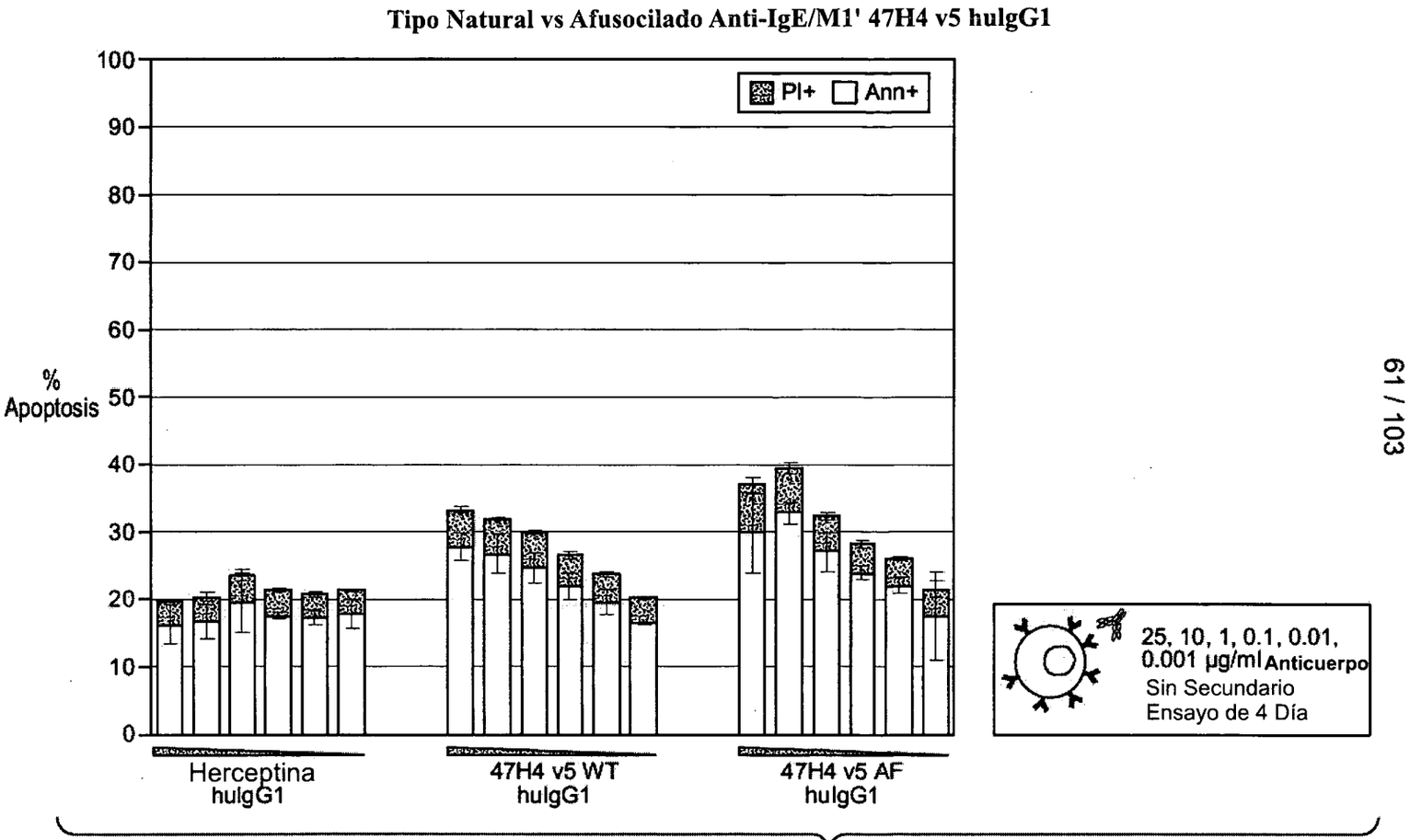

Tipo Natural vs Afusocilado Anti-IgE/M1' 47H4 v5 hulgG1
PI+
Ann+
% Apoptosis
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Herceptina huIgG1
47H4 v5 WT huIgG1
47H4 v5 AF huIgG1
25, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 µg/ml Anticuerpo
Sin Secundario
Ensayo de 4 Día

FIG. 8C

Flujo de Calcio Inducido por Anticuerpo Anti-M1'

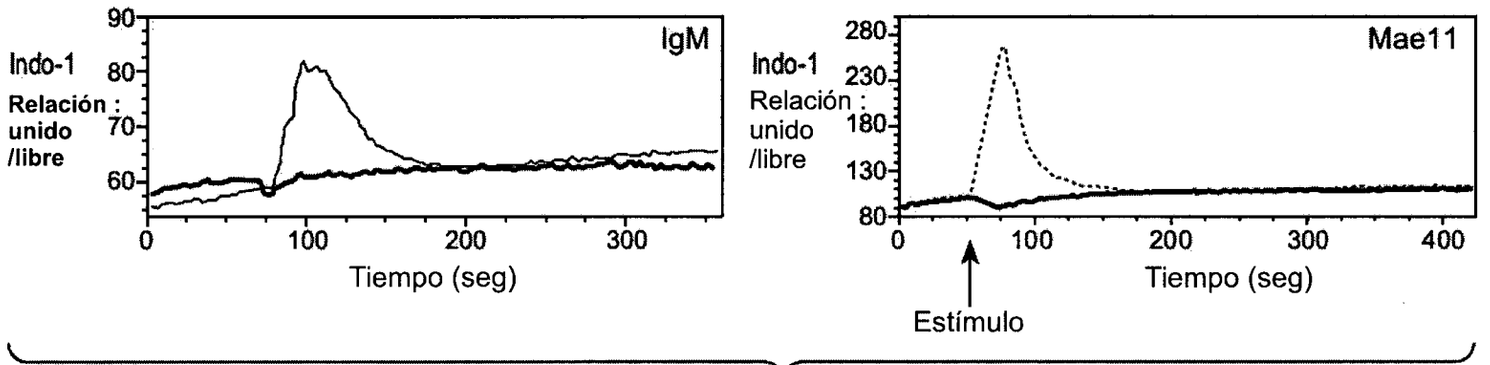


FIG. 9A

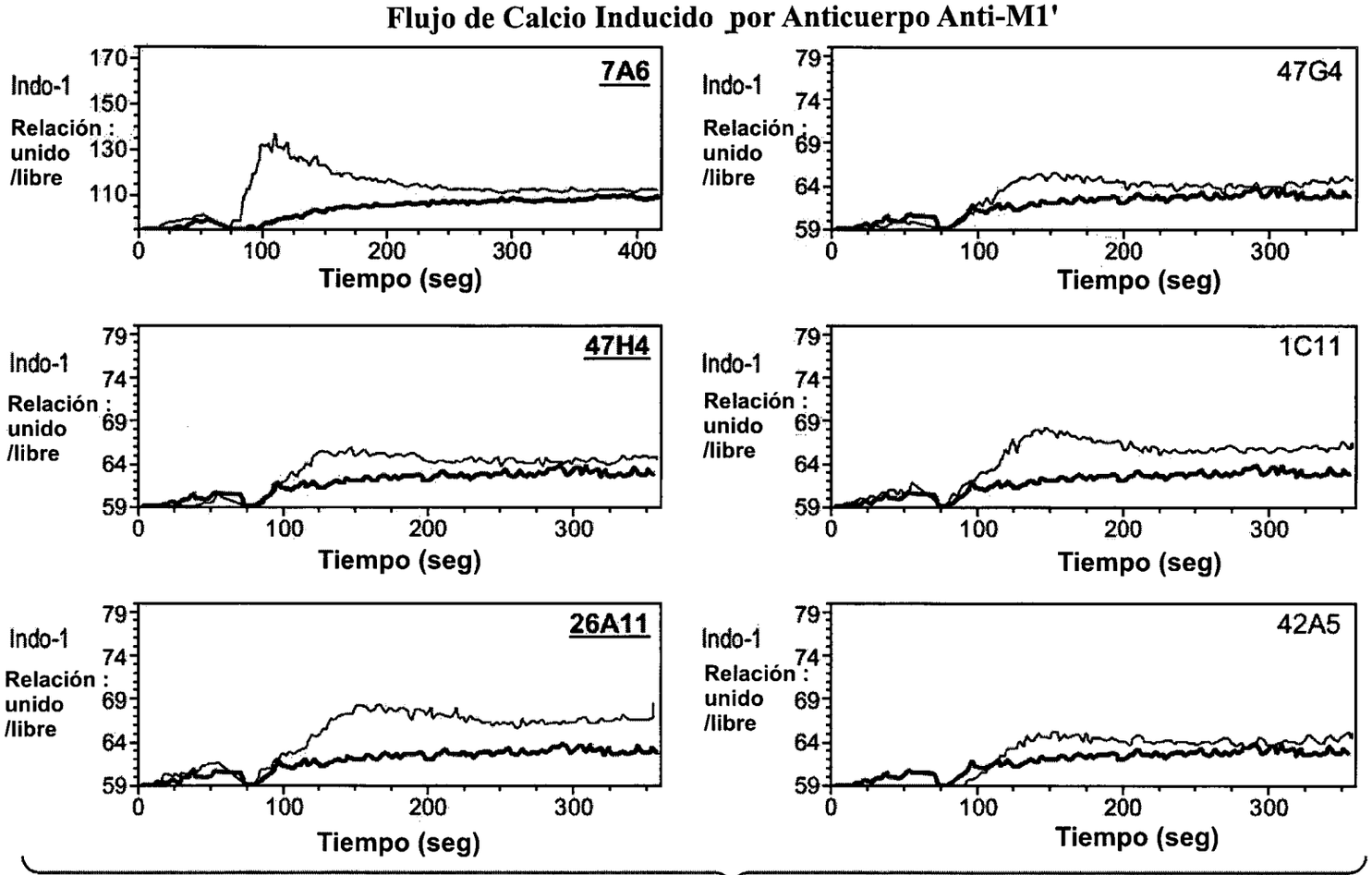

Flujo de Calcio Inducido por Anticuerpo Anti-M1'
7A6
47G4
47H4
1C11
26A11
42A5
Indo-1
Relación : unido /libre
Tiempo (seg)
170
150
130
110
79
74
69
64
59
0
100
200
300
400

FIG. 9B-1

Estímulo

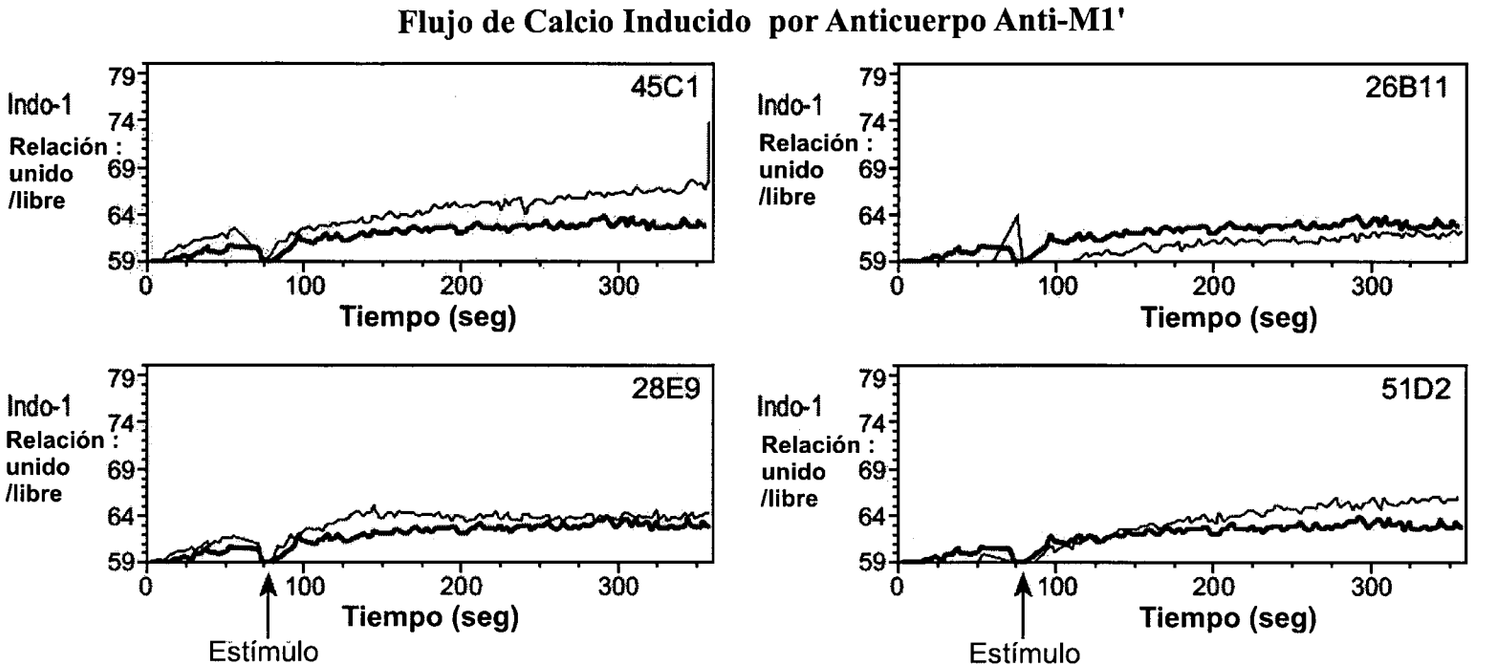


FIG. 9B-2

FIG. 9B-1

FIG. 9B-2

FIG. 9B

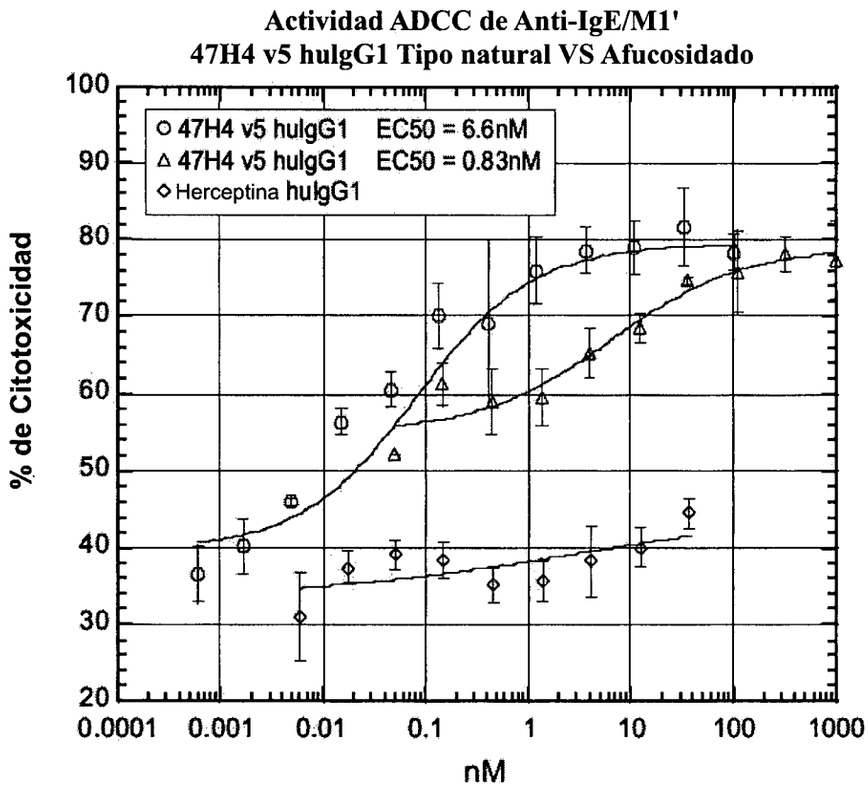

Actividad ADCC de Anti-IgE/M1'
47H4 v5 hulgG1 Tipo natural VS Afucosidado
% de Citotoxicidad
nM
47H4 v5 hulgG1 EC50 = 6.6nM
47H4 v5 hulgG1 EC50 = 0.83nM
Herceptina hulgG1
100
90
80
70
60
50
40
30
20
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000

FIG. 10

7A6

7A6 HC mIgG1

*QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKAS*GYTFIDYEMH*WVKQTPVHGLEWIG*AIDPETGTTAYNQKF
*KGKATLTAAKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCT*RLRPHYDYDNAMDS*WGQGTTLTVSSASTKGP*
// SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS
SVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI
TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP
GK

7A6 LC mkappa

*DIVMSQSPSSLTVSVGEKVTL*SCKSSQTLLYSTNQKNYLA*WYQQKPGQSPKLLIY*WASTRESG*V
*PDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC*QQYYSYPYTF*GGGT* // KVEIKRADAAPTVSIF
PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11A

47H4

47H4 HC mIgG1

*EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS*GFTFSDYGMA*WVRQAPGKGPEWVA*FISDLAYTIYYADTV
*TG*RFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDTALYYCAR*DNWDAMDY*WGQGTSVTVSSAKTTPP // S
SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTP
KVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

47H4 LC mkappa

*DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISC*RSSQSLVHNNGNTYLH*WYLQKPGQSPKLLIY*KVSNRFS*GVP
*DRFSGSGSGTDFTLKISRLEAEDLGVYFC*SQNTLVPWTF*GGGT* // KVEIKRADAAPTVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTK
DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11B

26A11

26A11 HC mIgG1

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMMWVKQSHGKSLEWIGDINPNNYDTSYNQKF
KGKATLTVDKSSSTAYIQLNSLTSEDSAVYYCASKAYWGQGTLVTVSAASTTPP // SVYPLA
PGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWP
SETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTPKVTCVV
VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA
FPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY
KNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

26A11 LC mkappa

DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITCRSSQDISNSLNWYQQKPDGPVKLLIYSTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDLATYFCQQGHTLPWTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER
HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11C

45C1

45C1 HC mIgG2a

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYVDDF
KGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDMATYFCARGIYYDNDDIYWGQGTILTVSSAKTTAP //
SVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
TSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL
MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMS
GKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV
EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR
TPGK

45C1 LC mkappa

DIVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP
DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPHTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIFP
PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTK
DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11D

28E9

28E9 HC mIgG1

EVKLVESEGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTDYYMSWVRQPPGKPLEWLGFISNKLNGYTTEYSS
SVQGRFTISRDDSQSILYLQMNTLRPEDSAAYYCARDMVPYYYALDYWGQGTSVAVSSAKTTPP
// SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSS
SVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTI
TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK
EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEW
QWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSP
GK

28E9 LC mkappa

DIQMTQSPASLSVSVGETVTFTCRTSENIYTYLAWIQQKQGKSPQLLVYNAQILAEGVPSRFSG
SGSGSQFSLQINSLQPEDFGYYYCQHHYGTPFTFGSGT // KVEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYER
HNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11E

1C11

1C11 HC mIgG1

QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDFEMHWVKQTPVHGLEWIGAIAPETGTSAYNQKF
RGKATLTADISSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYCTIYYAAPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGP //
SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV
PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTITLTP
KVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNG
QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

1C11 LC mkappa

DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSVTDFPLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYPYTFGGGT // KVEIKRADAAPTVSIF
PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLT
KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

FIG. 11F

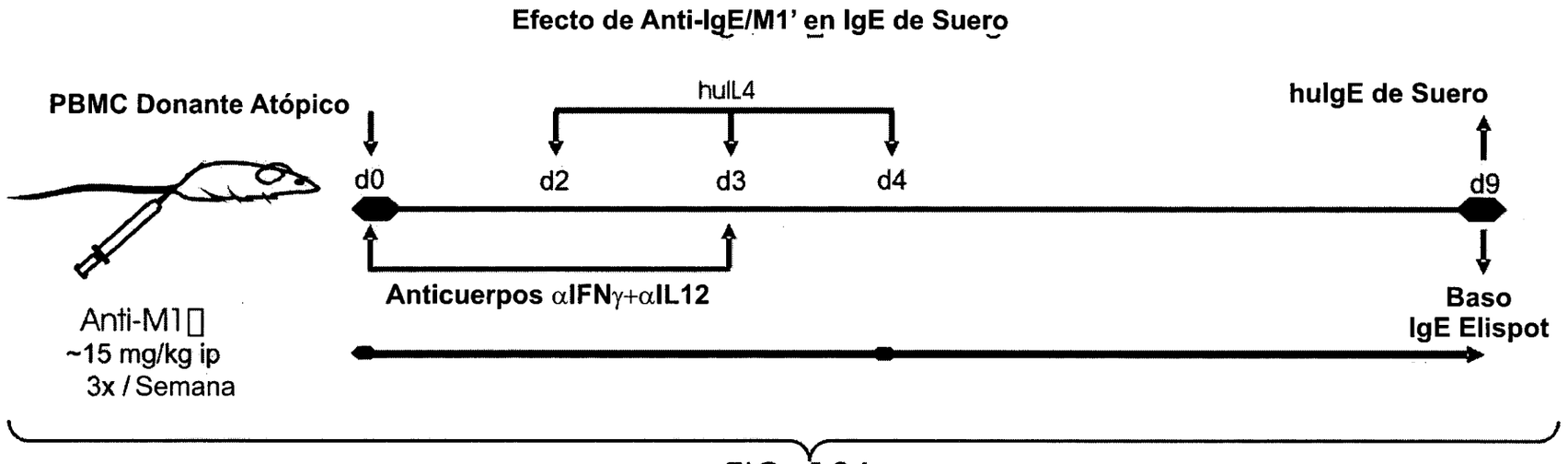

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgE de Suero
PBMC Donante Atópico
huIL4
huIgE de Suero
d0
d2
d3
d4
d9
Anticuerpos αIFNγ+αIL12
Baso
IgE Elispot
Anti-M1
~15 mg/kg ip
3x / Semana

FIG. 12A

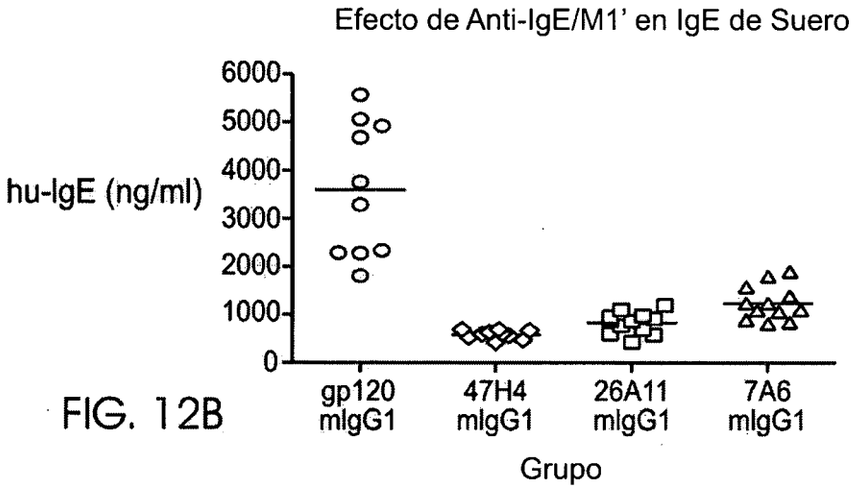


FIG. 12B

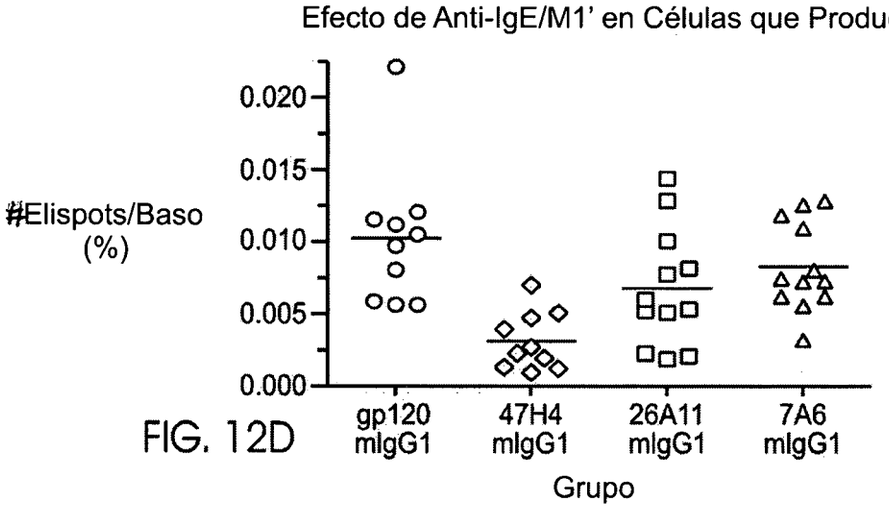


FIG. 12D

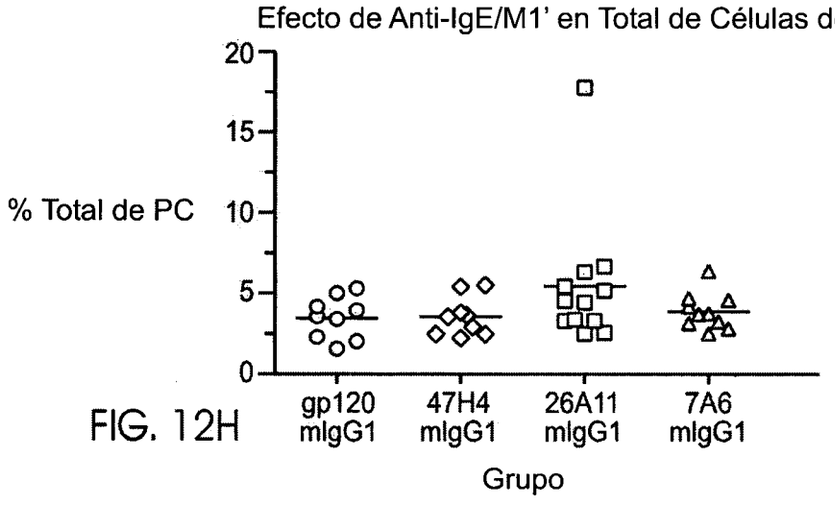


FIG. 12H

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgE de Suero

#07-0377	IgE Total ng/ml)			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-Valor
gp120 mIgG1	3606.0	1385.3	na	na
47H4 mIgG1	589.2	91.8	-83.7%	<0.0001
26A11 mIgG1	838.42	224.8	-76.7%	<0.0001
7A6 mIgG1	1248.33	360.4	-65.4%	<0.0001

FIG. 12C

Efecto de Anti-IgE/M1' en Células que Producen IgE

#07-0377	Elispots/Baso (%)			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-Valor
gp120 mIgG1	0.0103	0.0040	na	na
47H4 mIgG1	0.0032	0.0020	-68.9%	0.0003
26A11 mIgG1	0.0068	0.0040	-34.0%	0.0815
7A6 mIgG1	0.0083	0.0030	-19.4%	0.4518

FIG. 12E

Efecto de Anti-IgE/M1' en Total de Células de Plasma

#07-0377	% Total de PC			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-Valor
gp120 mIgG1	4.24	1.52	na	na
47H4 mIgG1	4.20	1.30	-1%	1.0000
26A11 mIgG1	6.18	4.51	+45.8%	0.2667
7A6 mIgG1	4.6	1.28	+8.5%	0.9835

FIG. 12I

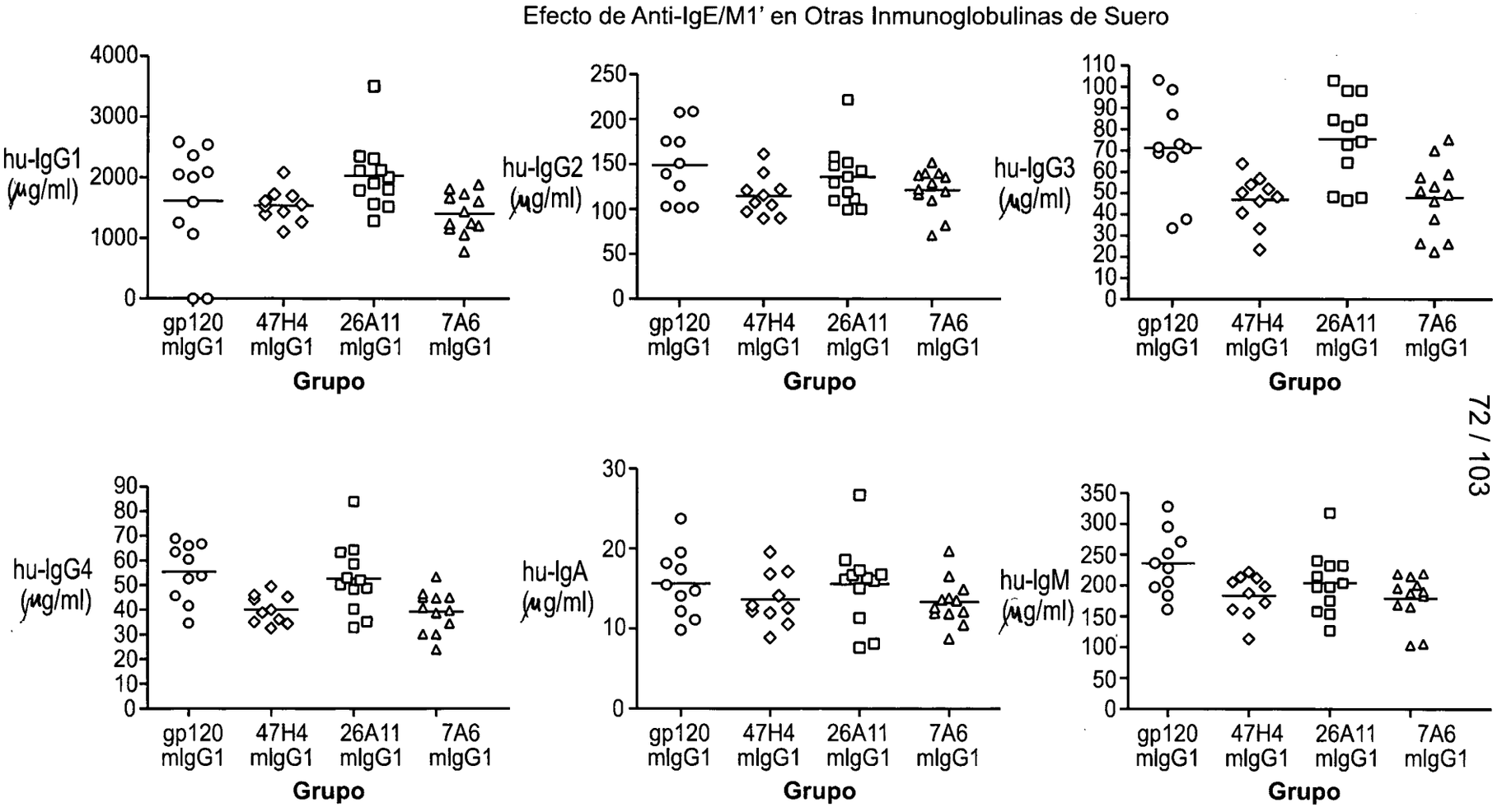

Efecto de Anti-IgE/M1' en Otras Inmunoglobulinas de Suero
hu-IgG1 (µg/ml)
hu-IgG2 (µg/ml)
hu-IgG3 (µg/ml)
hu-IgG4 (µg/ml)
hu-IgA (µg/ml)
hu-IgM (µg/ml)
gp120 mIgG1
47H4 mIgG1
26A11 mIgG1
7A6 mIgG1
Grupo

FIG. 12F

Efecto de Anti-IgE/M1' en Otras Inmunoglobulinas de Suero

#07-0377	huIgG1				huIgG2			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
gp120 mIgG1	1936.8	512.2	na	na	149.4	41.5	na	na
47H4 mIgG1	1540.8	269.1	-20.4	0.1265	115.4	22.7	-22.8	0.0504
26A11 mIgG1	2028.7	567	+4.7	0.9278	136.4	33.8	-8.7	0.6399
7A6 mIgG1	1406.8	341	-27.4	0.0210	121.8	24.2	-18.5	0.1125

#07-0377	huIgG3				huIgG4			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
gp120 mIgG1	71.1	22.7	na	na	55.7	11.8	na	na
47H4 mIgG1	46.8	11.9	-34.2	0.0143	40.5	5.8	-27.3	0.0071
26A11 mIgG1	75.4	20.2	+6.0	0.9013	53	14	-4.8	0.8799
7A6 mIgG1	47.9	17	-32.6	0.0138	39.7	8.4	-28.7	0.0031

#07-0377	huIgM				huIgA			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
gp120 mIgG1	236.9	51.7	na	na	15.7	4.2	na	na
47H4 mIgG1	184.8	33.8	-22	0.0321	13.7	3.3	-12.7	0.5443
26A11 mIgG1	205.2	50	-13.4	0.2375	15.6	5	-0.6	+1.0
7A6 mIgG1	180.2	39.2	-23.9	0.0131	13.4	2.9	-14.6	0.3992

FIG. 12G

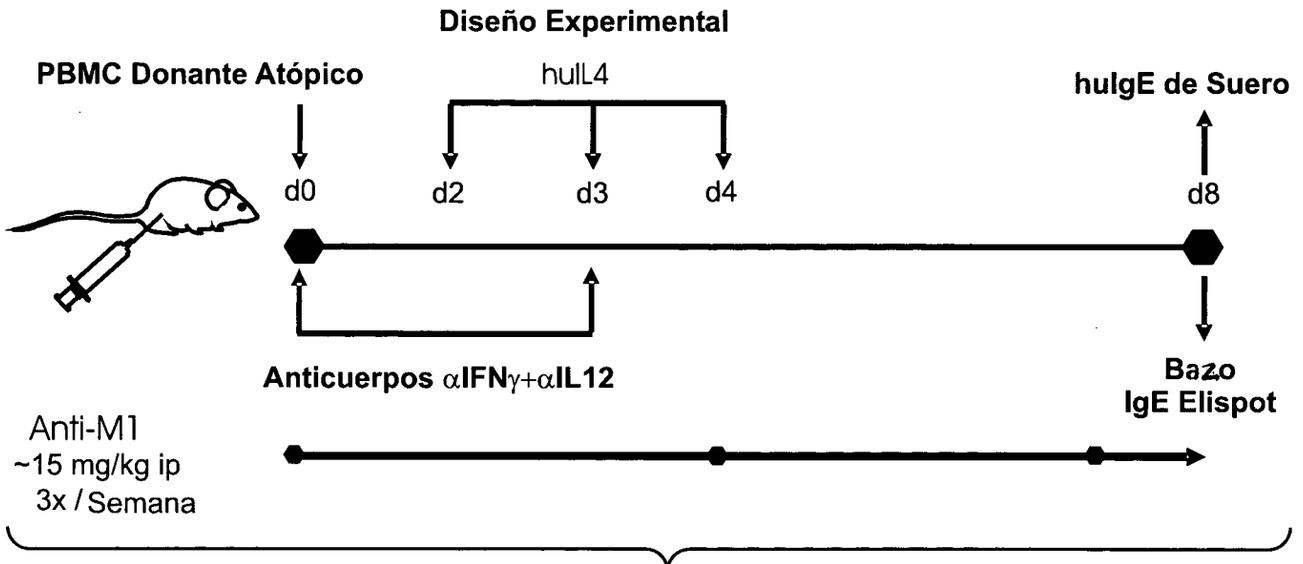


FIG. 13A

Efecto de 47H4 v5 en celular que producen IgE y IgE en Suero

#07-1232	Total IgE (ng/ml)				Frecuencia Elispot hu-IgE			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
huIgG1 de Herceptina	3158.2	1458.5	na	na	0.0108	0.0029	na	na
47H4 v5 huIgG1	651.9	272.8	-79.4%	<0.0001	0.0028	0.0011	-74.5%	<0.0001

FIG. 13D

Efecto de 47H4 v5 en celular que producen IgE y IgE en Suero

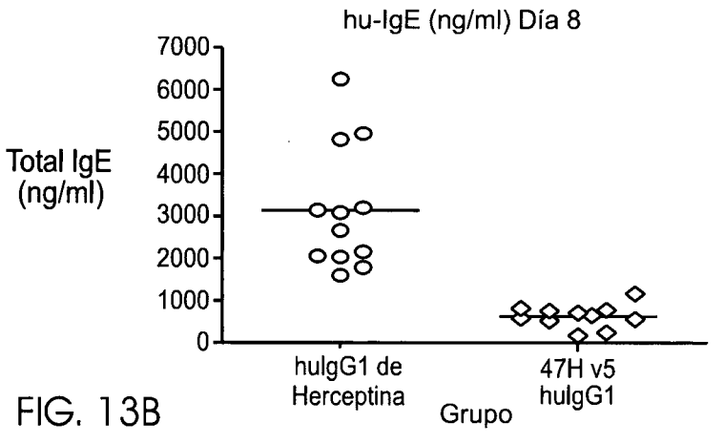


FIG. 13B

Efecto de 47H4 v5 en células que Producen IgE

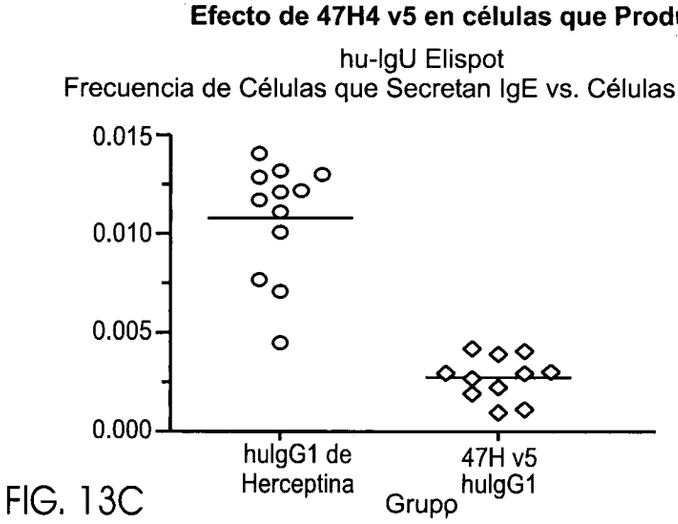


FIG. 13C

Efecto de 47H4 v5 en Total de Células de Plasma

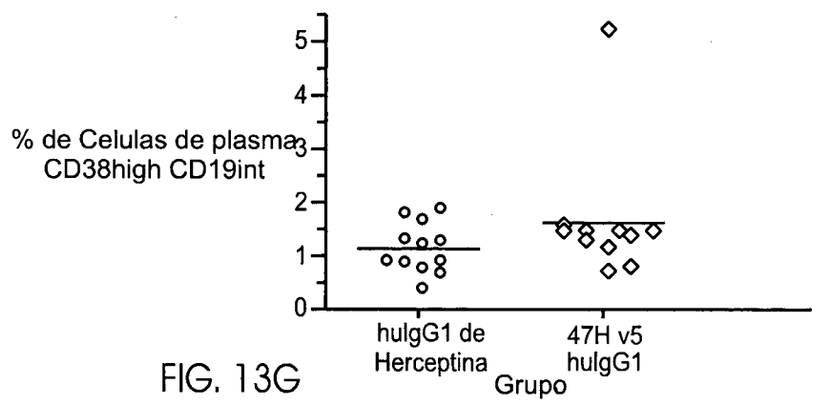


FIG. 13G

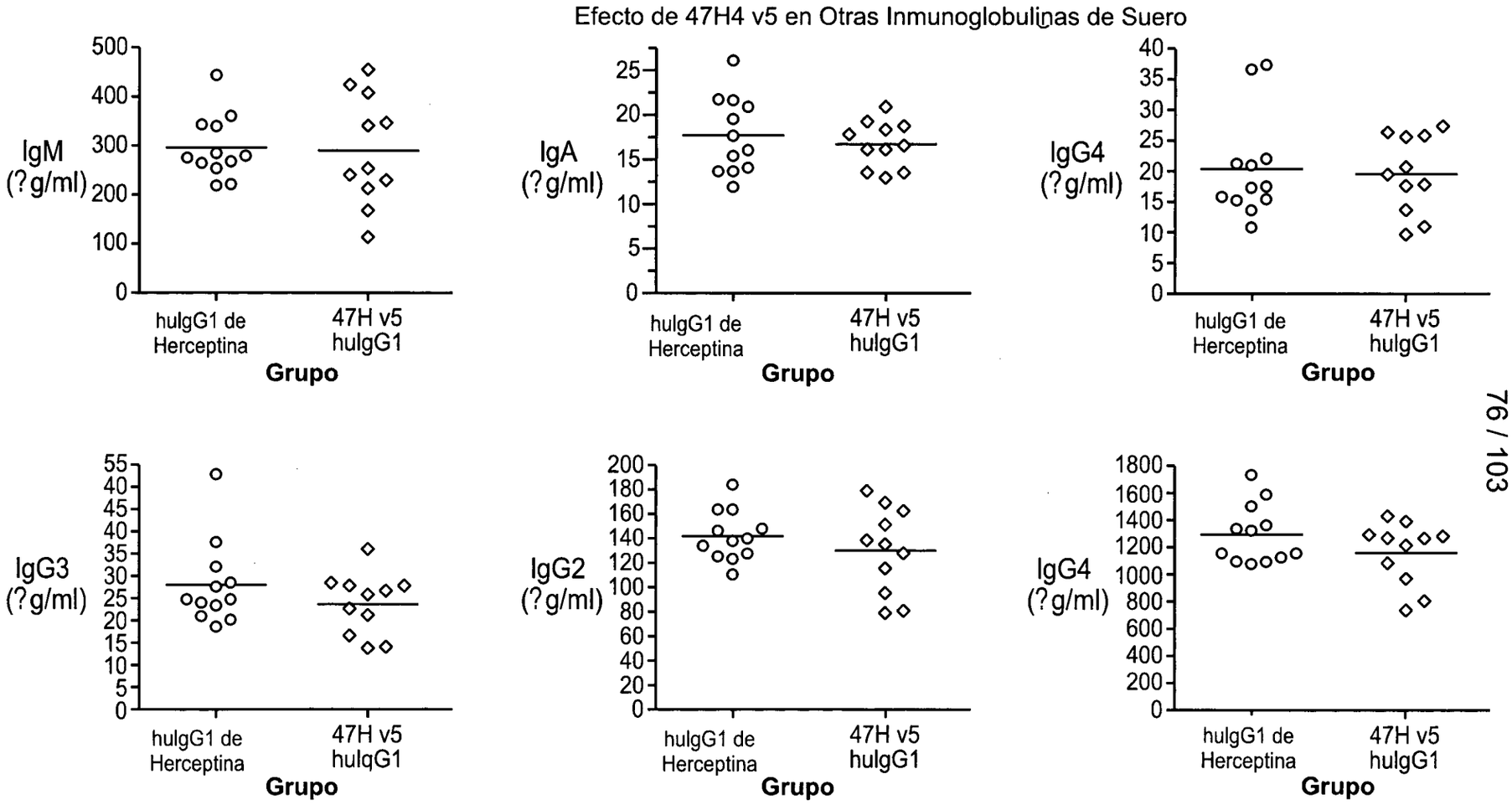

Efecto de 47H4 v5 en Otras Inmunoglobulinas de Suero
IgM (?g/ml)
IgA (?g/ml)
IgG4 (?g/ml)
IgG3 (?g/ml)
IgG2 (?g/ml)
IgG4 (?g/ml)
hulgG1 de Herceptina
47H v5 hulgG1
47H v5 hulqG1
Grupo

FIG. 13E

Efecto de 47H4 v5 en Otras Inmunoglobulinas de Suero

	huIgG1				huIg2			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
huIgG1 de Herceptina	1304.8	221	na	na	142.2	20.5	na	na
47H4 v5 huIgG1	1165.2	232.4	-10.7	0.1545	130.7	34.7	-8.1	0.3357

	huIg3				huIgG4			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
huIgG1 de Herceptina	27.9	9.5	na	na	20.5	8.9	na	na
47H4 v5 huIgG1	23.6	6.9	-15.4	0.2331	19.7	6.3	-3.9	0.808

	huIgA				huIgM			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
huIgG1 de Herceptina	17.7	4.3	na	na	296.1	64.6	na	na
47H4 v5 huIgG1	16.7	2.6	-5.6	0.5243	290.3	111.7	-2	0.8791

FIG. 13F

Efecto de 47H4 v5 en Total de Células de Plasma

	Total PC %			
Grupo	Media	S.D.	% de Cambio	p-valor
huIgG1 de Herceptina	1.2%	0.46%	na	na
47H4 v5 huIgG1	1.6%	1.2%	+33.3%	0.2132

FIG. 13H

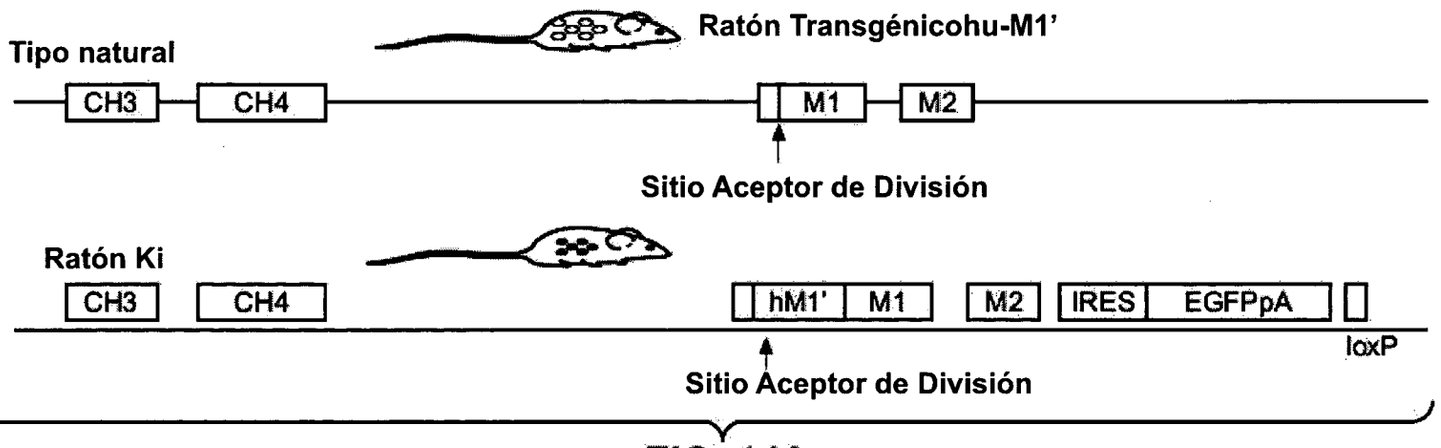


FIG. 14A

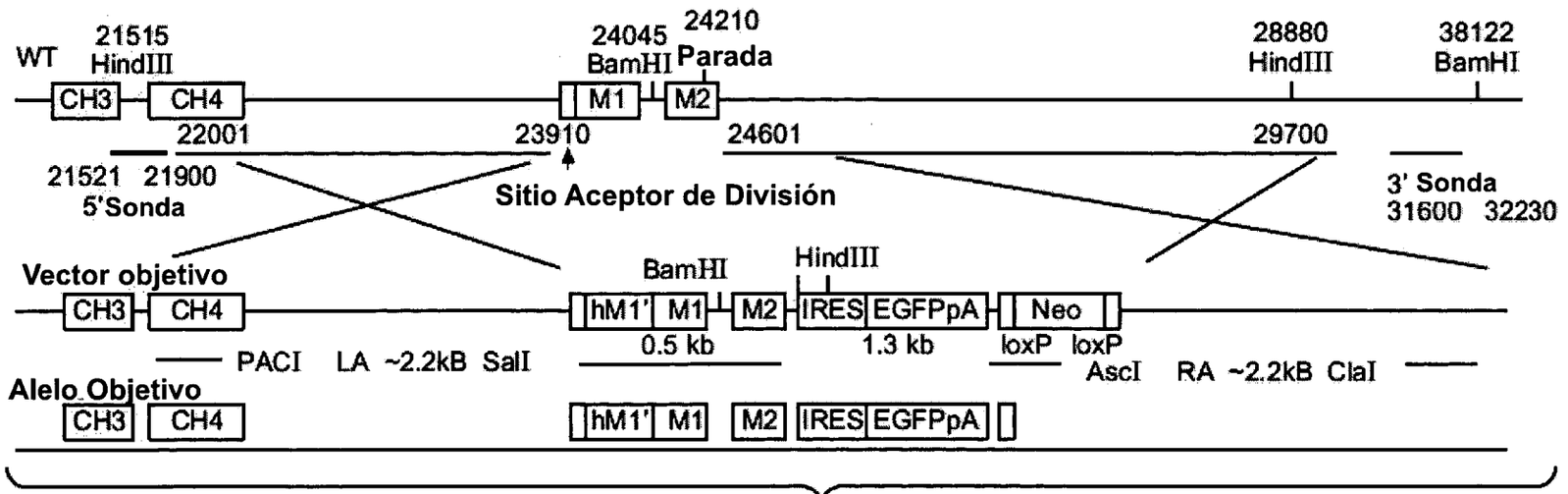


FIG. 14B

hu-M1` Ratón Transgénico

Genotipo PCR

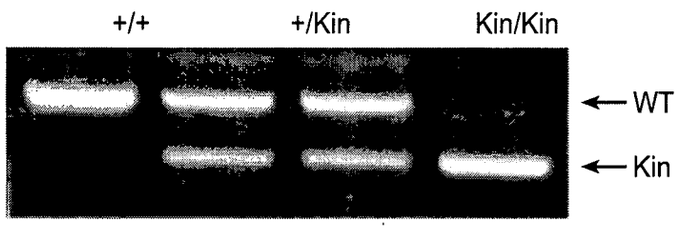
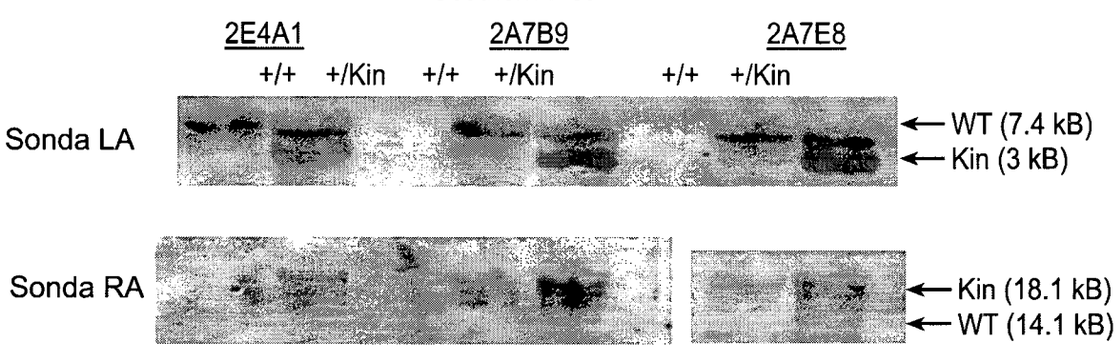


FIG. 14C

hu-M1` Ratón Transgénico

Southern Blot



Detección Souther

Digestión Hind III de Brazo Izquierdo — WT: 7.4 kb; KI: 3.0 kb

Digestión BamHI de Brazo Derecho — WT: 14.1 kb; KI: 18.1 kb

FIG. 14D

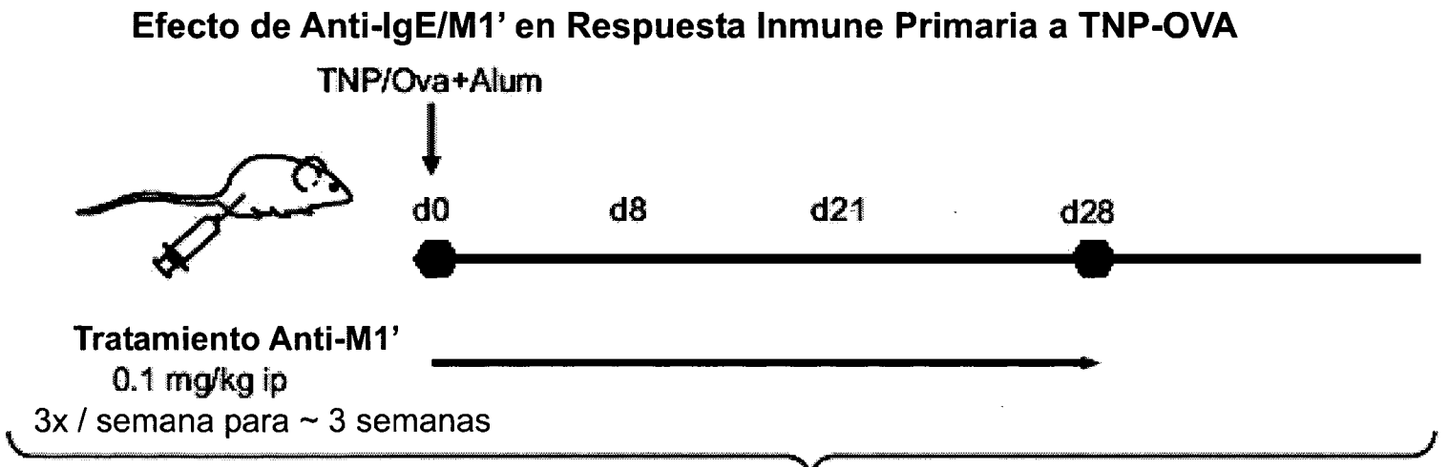

Efecto de Anti-IgE/M1' en Respuesta Inmune Primaria a TNP-OVA
TNP/Ova+Alum
d0
d8
d21
d28
Tratamiento Anti-M1'
0.1 mg/kg ip
3x / semana para ~ 3 semanas

FIG. 15A

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles IgE de Respuesta Inmune Primaria a TNP-OVA

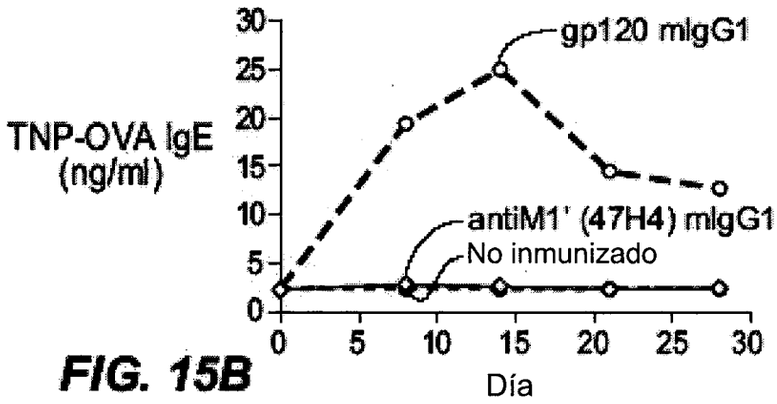


FIG. 15B

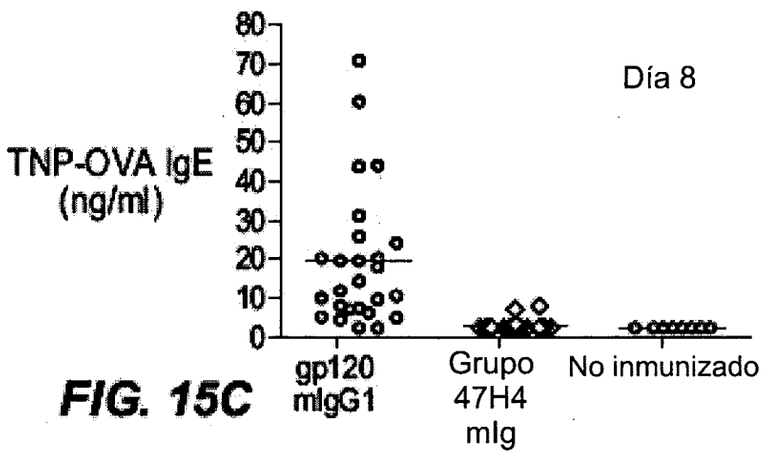


FIG. 15C

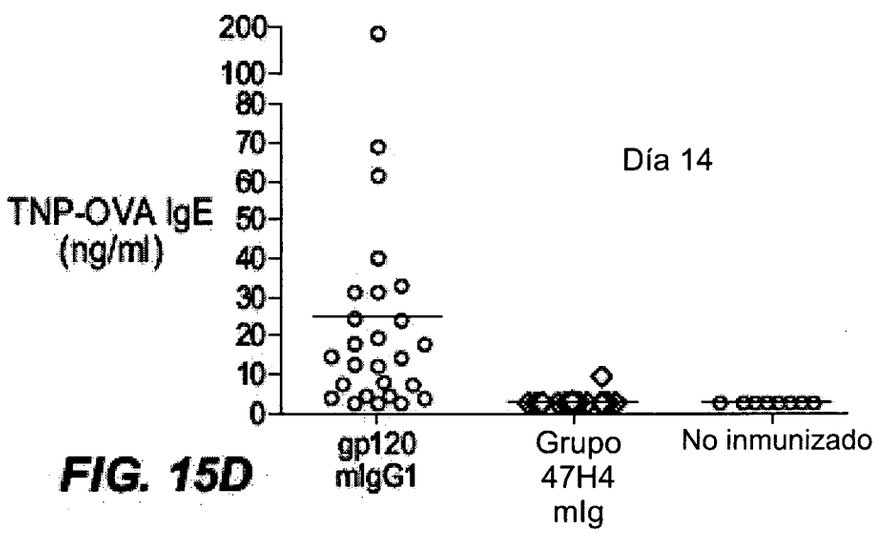


FIG. 15D

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles IgE de Respuesta Inmune Primaria a TNP-OVA

#07-0234 F	mIgE Día 8				mIgE Día 14			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	19.3	17.8	na	na	25	36.8	na	na
47H4 mIgG1	2.8	1.4	-97.5%	<0.0001	2.6	1.4	-98.7%	0.0033
No inmunizado	<2.3	0	-100.0%	0.0015	<2.3	0	-100%	0.0490

FIG. 15E

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles de IgG1 de Respuesta Inmune Primaria a TNP-OVA

	mIgG1 Día 8				mIgG1 Día 14			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	3467.1	2841.7	na	na	40592.8	32951.3	na	na
47H4 mIgG1	2393.3	2049.5	-31.1%	0.1835	25363.4	11750.8	-37.5%	0.0407
No inmunizado	3.4	5.1	-100%	0.0010	11.4	21.8	-100%	0.0001

FIG. 15I

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles de IgG1 de Respuesta Inmune Primaria a TNP-OVA

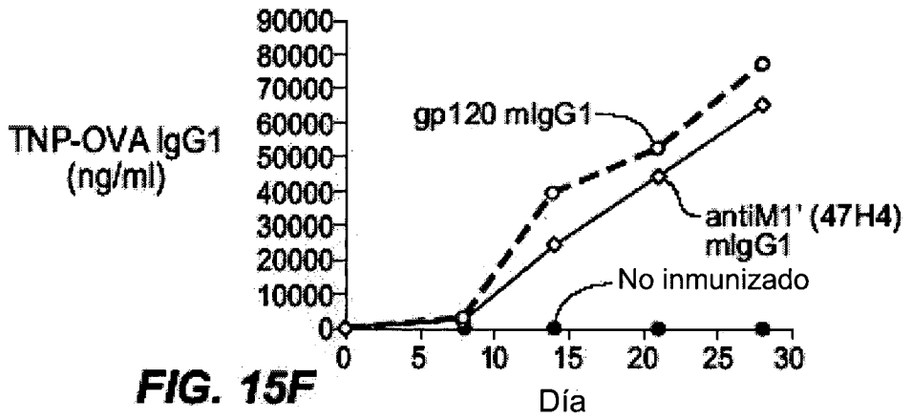


FIG. 15F

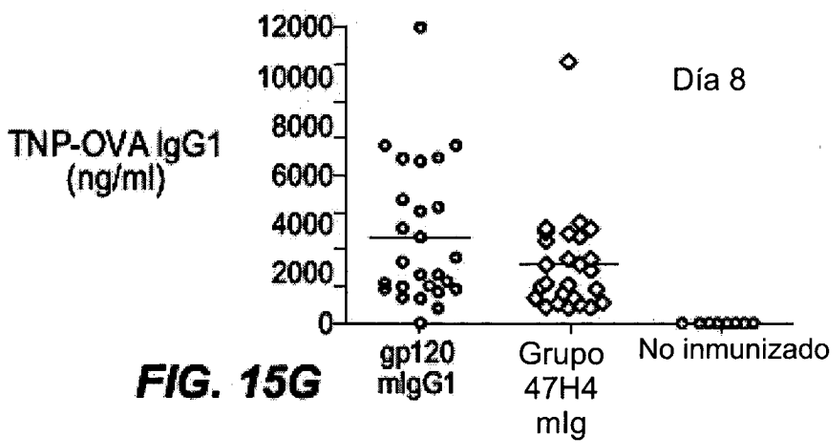


FIG. 15G

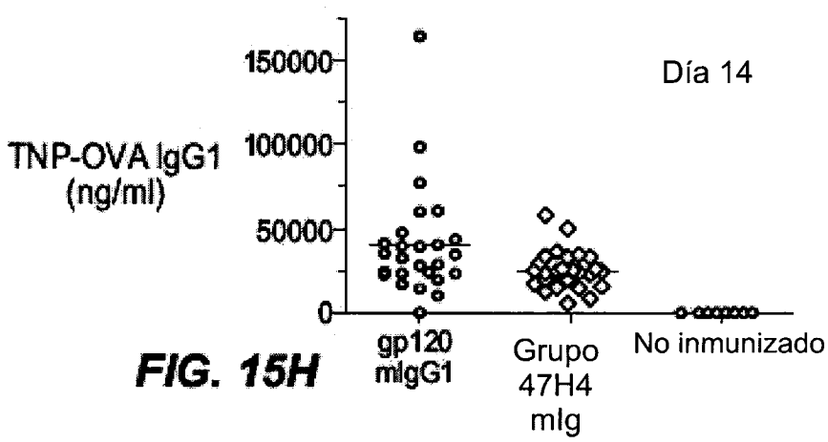


FIG. 15H

Efecto de Anti-IgE/M1' en Respuesta Secundaria/Memoria a TNP-OVA

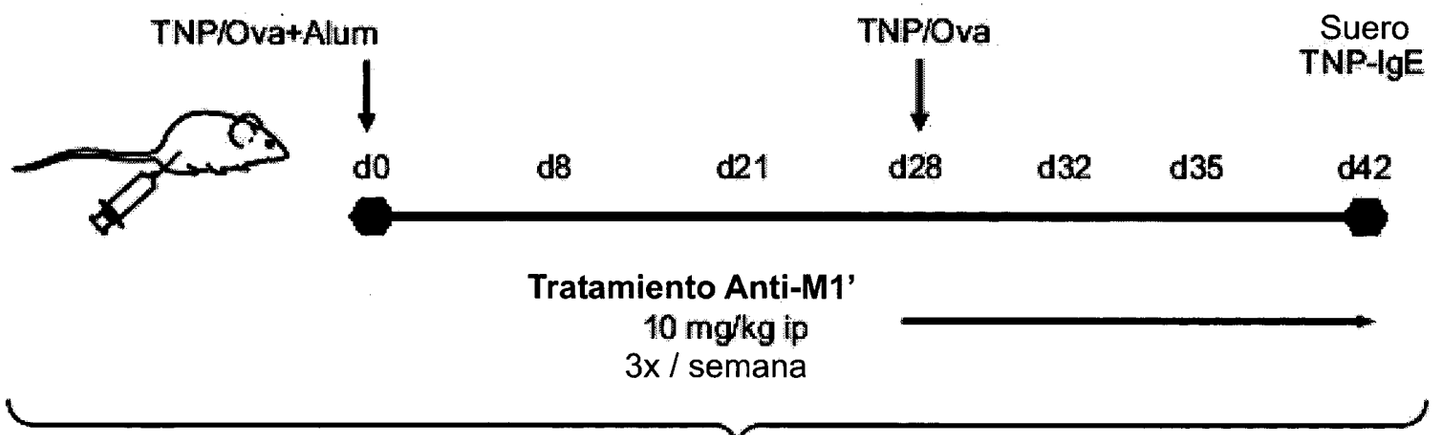
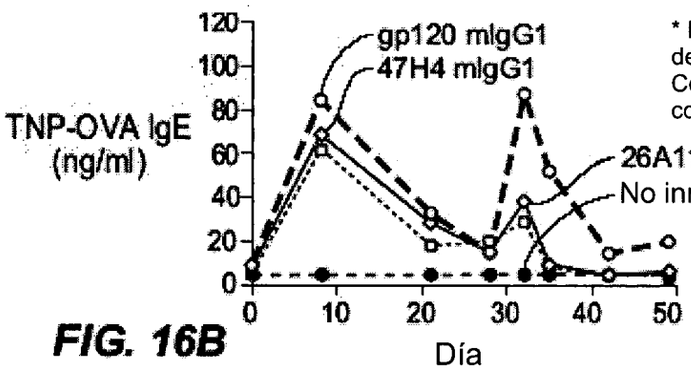


FIG. 16A

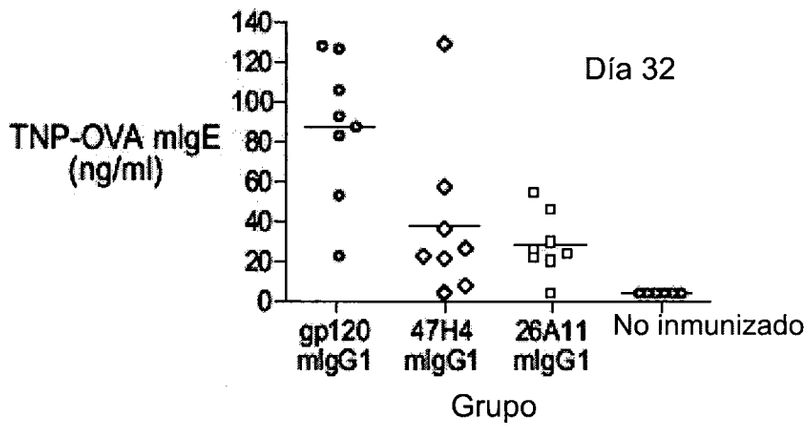
Efecto de Anti-IgE/M1' en Respuesta Secundaria /Memoria a TNP-OVA



* Estadísticamente significativo de control de isotipo con Corrección de Bonferroni para comparación en forma de

FIG. 16B

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles de IgE en Respuesta Inmune de Memoria a TNP-OVA



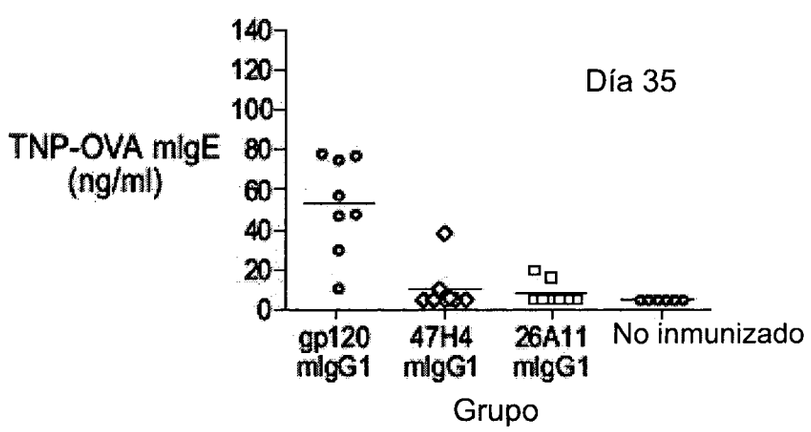


FIG. 16C

Efecto de Anti-IgE/M1' en Respuesta Secundaria /Memoria a TNP-OVA

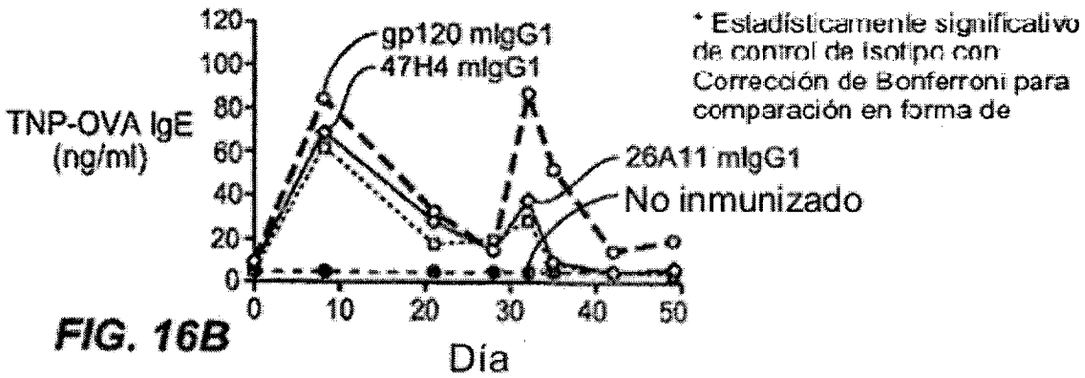
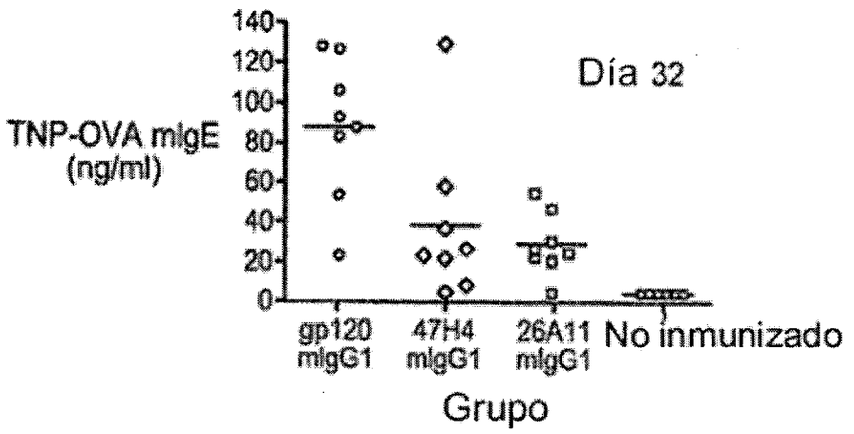


FIG. 16B

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles de IgE en Respuesta Inmune de Memoria a TNP-OVA



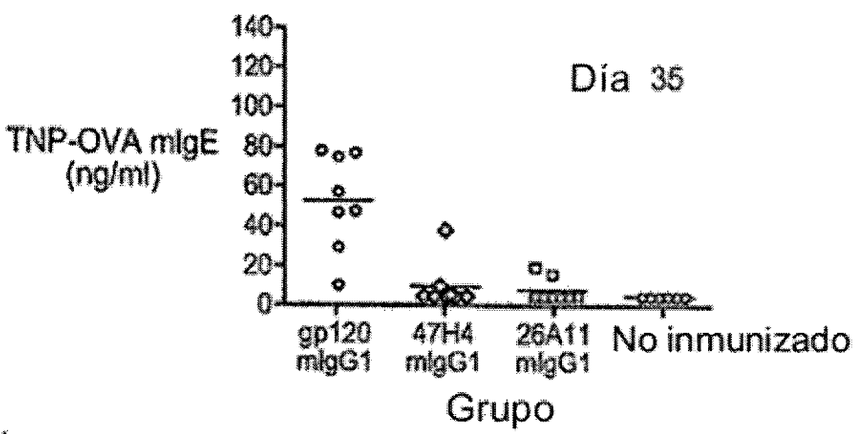


FIG. 16C

Efecto de Anti-IgE/M1' en Niveles IgE de Respuesta Inmune de Memoria a TNP-OVA

FIG. 16D

#07-0234 B	TNP-OVA IgE (ng/ml) Día 32				TNP-OVA IgE (ng/ml) Día 35			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	87.3	35.3	na	na	52.3	24	na	na
47H4 mIgG1	38.5	40	-59.1%	0.0066	9.7	11.6	-89.5%	<0.0001
26A11 mIgG1	25.3	12.5	-75.1%	0.001	7.8	5.8	-93.3%	<0.0001
No inmunizado	<4.69	0.0	-100%	<0.0001	<4.69	0.0	-100.0%	<0.0001

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgE en Respuesta Secundaria/Memoria Inducida por TNP-OVA

FIG. 16H

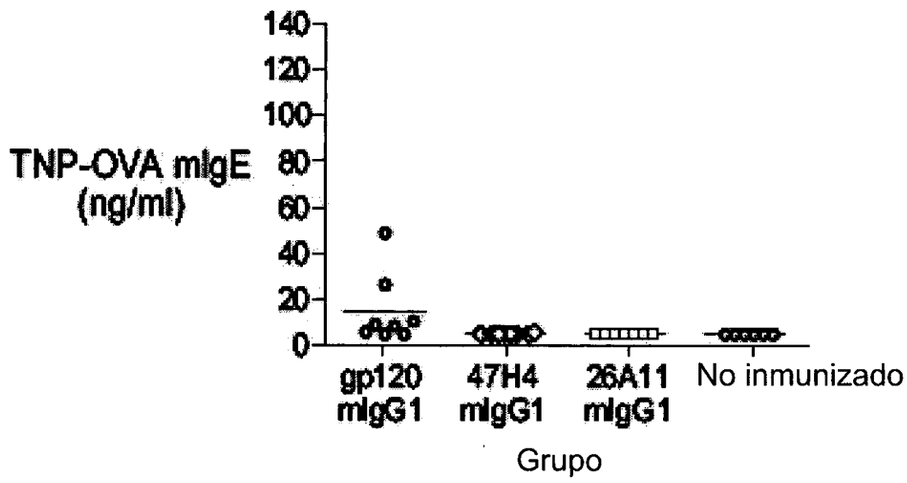
	AUC: TNP-OVA IgE (ng/ml)				Promedio Diario TNP-OVA IgE			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	770	316.4	na	na	36.7	15.1	na	na
47H4 mIgG1	271	208.5	-74.3%	0.0001	12.9	9.9	-74.3%	0.0001
26A11 mIgG1	214	61.6	-83.5%	<0.0001	10.2	2.9	-83.4%	<0.0001
No inmunizado	98.4	0.0	-100%	<0.0001	<4.69	0.0	-100%	<0.0001

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgG1 en Respuesta Secundaria/Memoria Inducida por TNP-OVA

FIG. 16K

	TNP-OVA mIgG1 (μg/ml) Día 28				TNP-OVA mIgG1 (μg/ml) Día 35			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	107	64.7	na	na	139	92.7	na	na
47H4 mIgG1	91.7	56.3	-14.3%	0.8966	149	73.8	+7.2%	0.9879
26A11 mIgG1	61.7	48.3	-42.3%	0.2544	99.3	84.4	-28.6%	0.6294
No inmunizado	<0.00078	0.0	-100%	0.0024*	<0.00078	0.0	-100%	0.006*

Reducción de IgE por Anti-IgE/M1' en Respuesta Secundaria/Memoria Inducida por TNP-OVA



#07-0234 B	TNP-OVA IgE (ng/ml) Día 42			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	14.7	15.4	na	na
47H4 mIgG1	4.78	0.25	-99.1%	0.059
26A11 mIgG1	4.78	0.24	-99.1%	0.071
No inmunizado	<4.69	0.0	-100%	0.083

FIG. 16E

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgE en Respuesta Secundaria/ Memoria Inducida por TNP-OVA

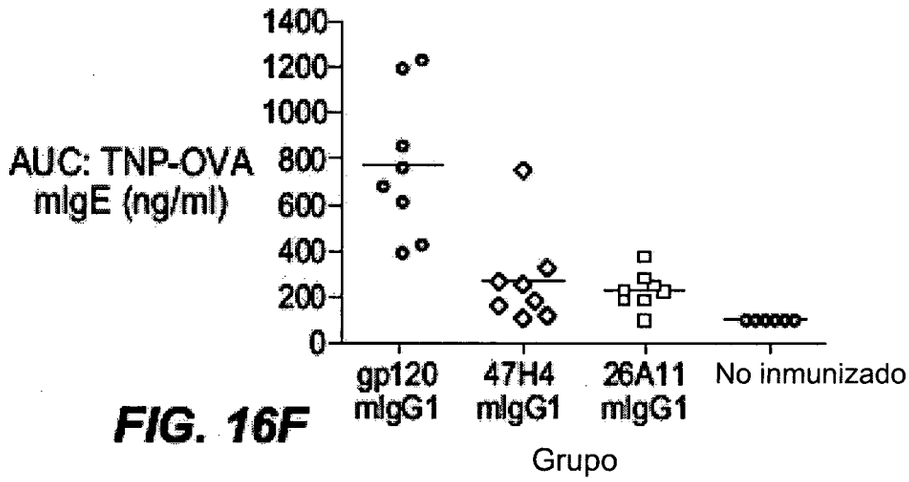


FIG. 16F

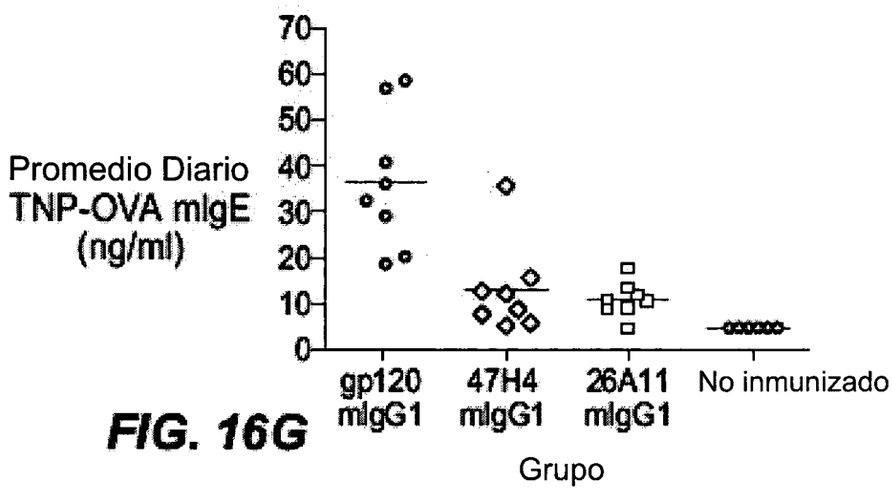


FIG. 16G

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgG1 en Respuesta Secundaria/ Memoria Inducida por TNP-OVA

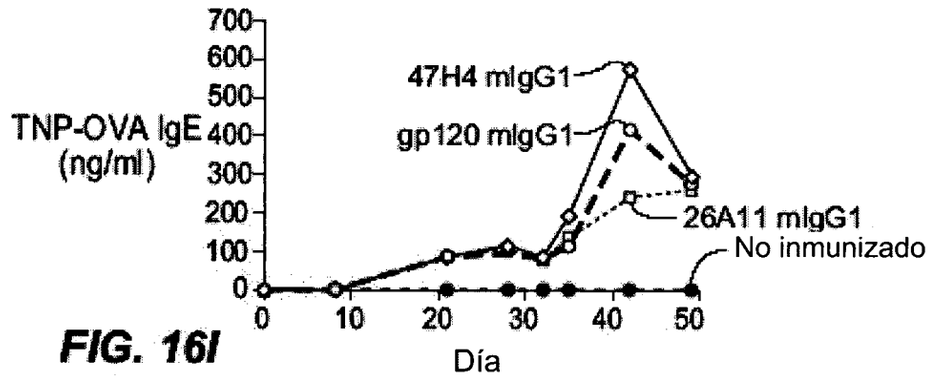


FIG. 16I

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgG1 en Respuesta Secundaria/ Memoria Inducida por TNP-OVA

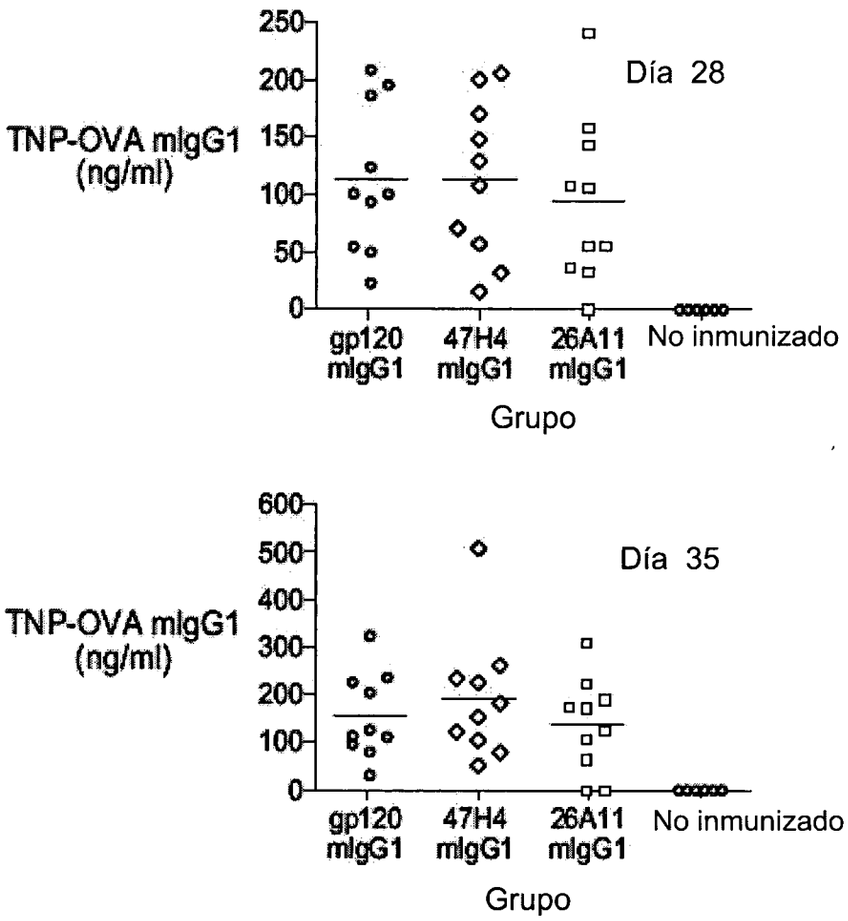


FIG. 16J

Efecto Preventivo en Producción de IgE de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

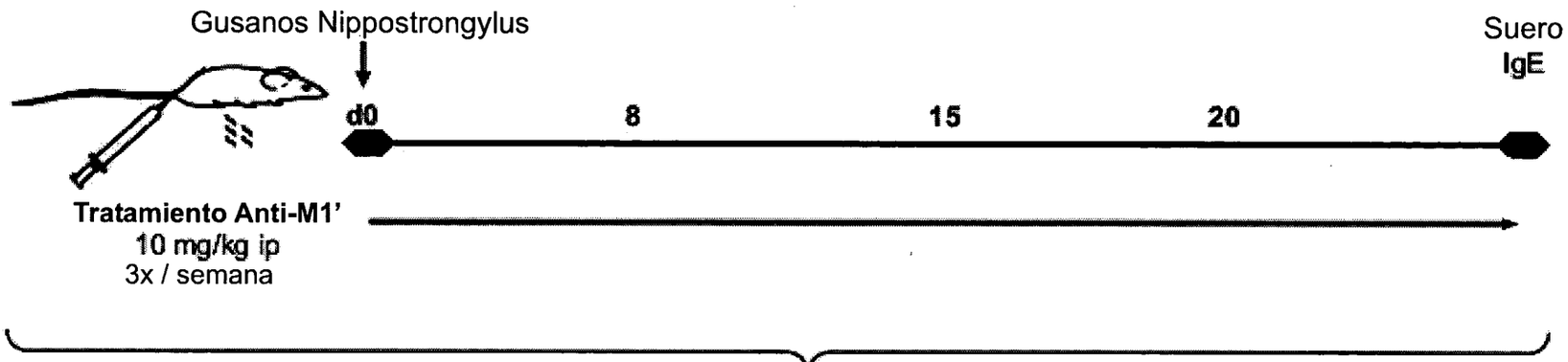


FIG. 17A

Efecto Preventivo en Producción de IgE de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

#07-0234 B	Suero Total IgE (ng/ml) Día 15			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	1633.6	738.8	na	na
47H4 mIgG1	166.3	70.4	93.8%	<0.0001
26A11 mIgG1	174	66.5	93.4%	<0.0001
No infectado	70.1	35.9	-100%	<0.0001

FIG. 17D

Efecto Preventivo en Producción IgE de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

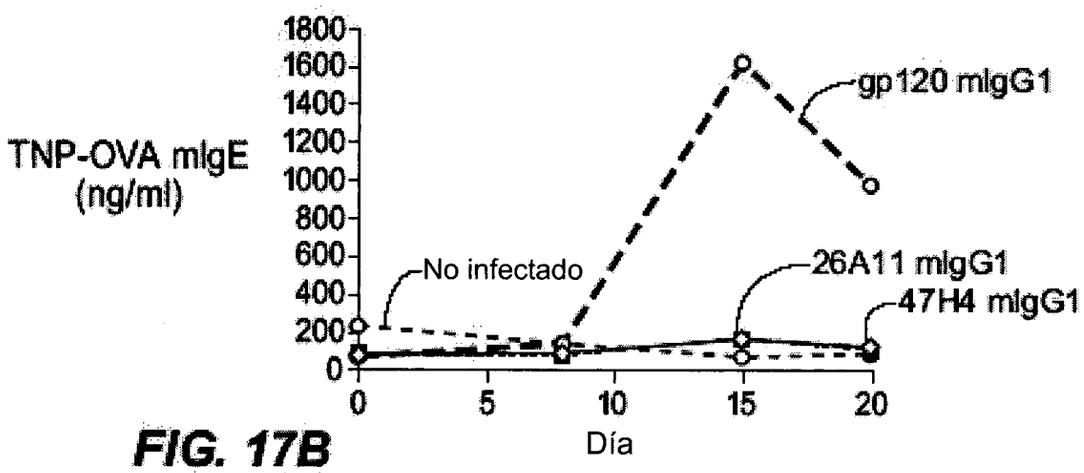


FIG. 17B

Efecto Preventivo en Producción IgE de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

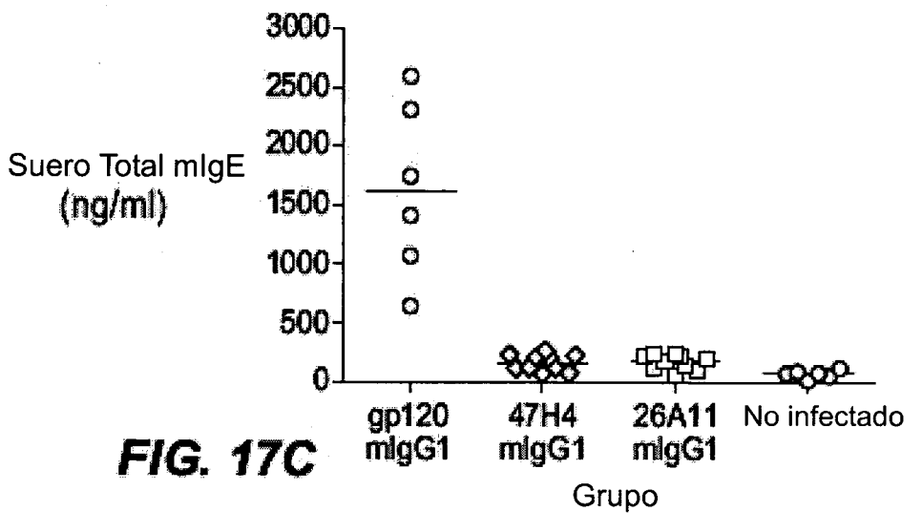


FIG. 17C

Efecto Terapéutico en Producción IgE Pico de Anticuerpos Anti-IgE/M1'



FIG. 18A

Efecto Terapéutico en Producción IgE Pico de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

	Total mIgE (ng/ml)			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	2289	1367	na	na
47H4 mIgG1	270	123	-89.0%	<0.0001*
26A11 mIgG1	431	332	-81.9%	<0.0001*
No inmunizado	20.72	29.12	-100%	<0.0001*

FIG. 18D

* Estadísticamente significativo de control de isotipo con Corrección de Bonferroni para comparación en forma de

Efecto Terapéutico en Producción IgE Pico de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

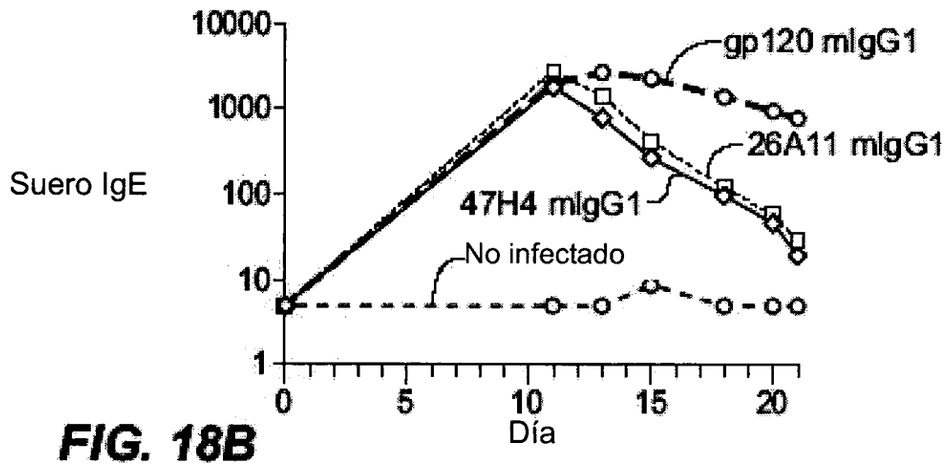


FIG. 18B

Efecto Terapéutico en Producción IgE Pico de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

~ 90% de Reducción IgE Dentro de 4 Días de Tratamiento

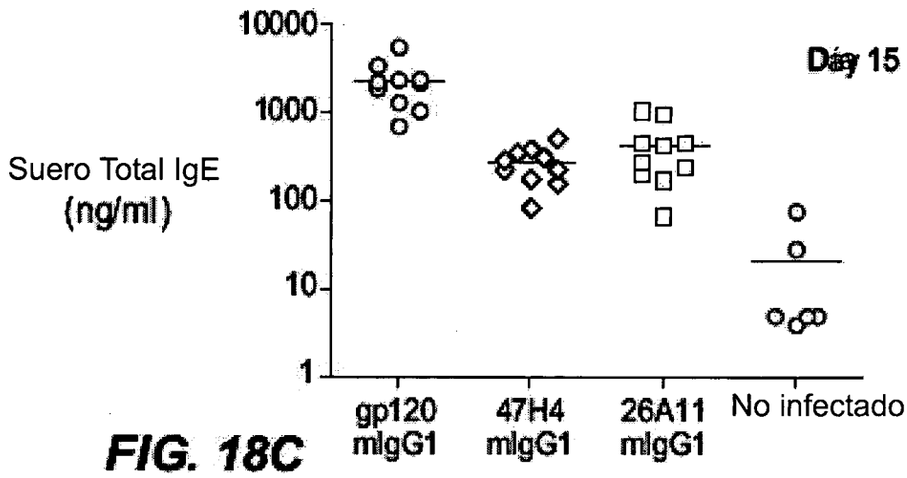
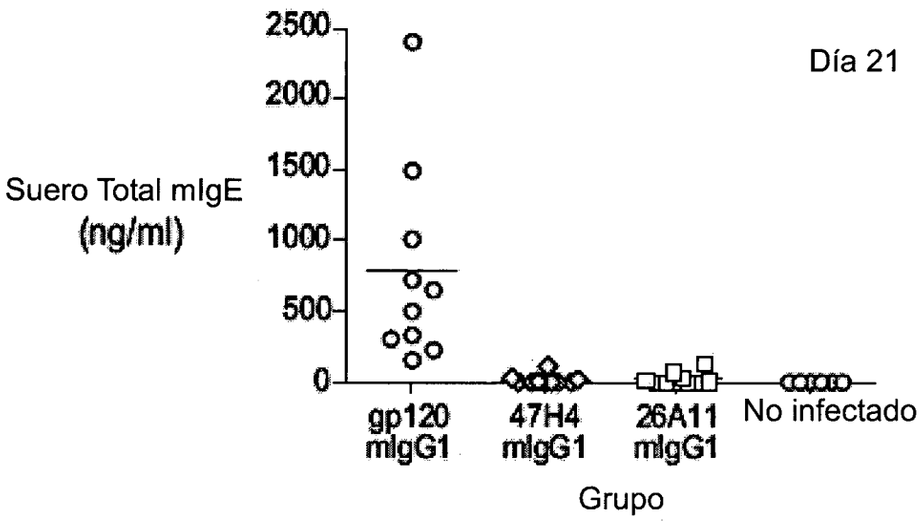


FIG. 18C

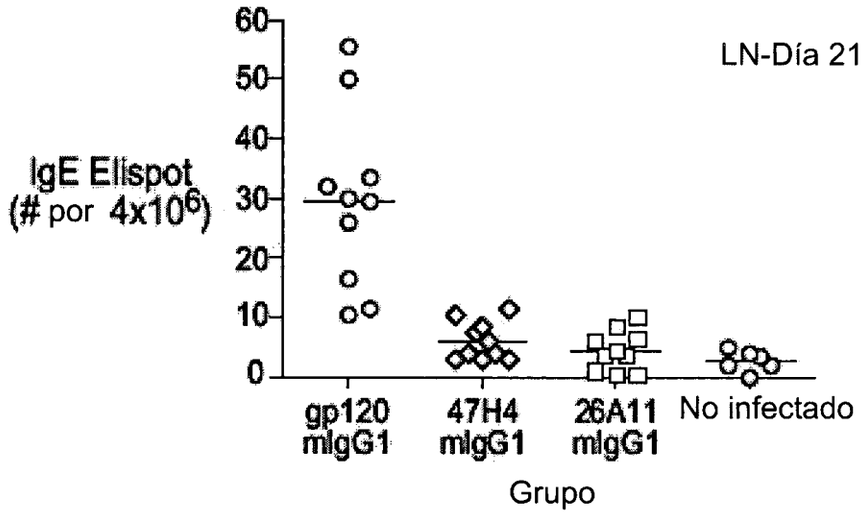
Efecto de Anti-IgE/M1' en Niveles IgE y Células que Producen IgE



	Total mIgE (ng/ml)			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
120 mIgG1	784.5	701	na	na
47H4 mIgG1	21.4	35.4	-97.9%	0.0002*
26A11 mIgG1	30.3	44.8	-96.8%	0.0002*
No inmunizado	5	0.0	-100%	0.0009*

FIG. 18E

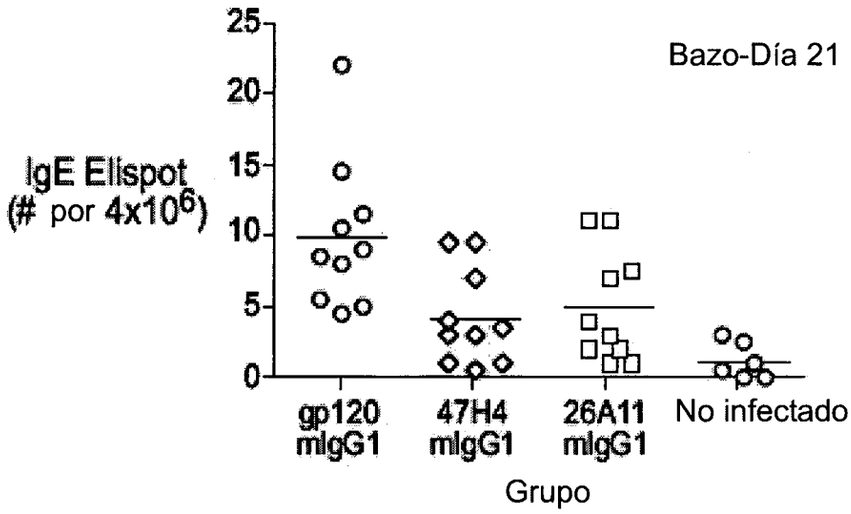
Efecto de Anti-IgE/M1' en Niveles IgE y Células que Producen IgE



	Frecuencia Elispot IgE LN			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
120 mIgG1	29.5	14.9	na	na
47H4 mIgG1	6.1	3.2	-87.6%	<0.0001*
26A11 mIgG1	4.5	3.3	-93.8%	<0.0001*
No inmunizado	2.8	1.8	-100	<0.0001*

FIG. 18F

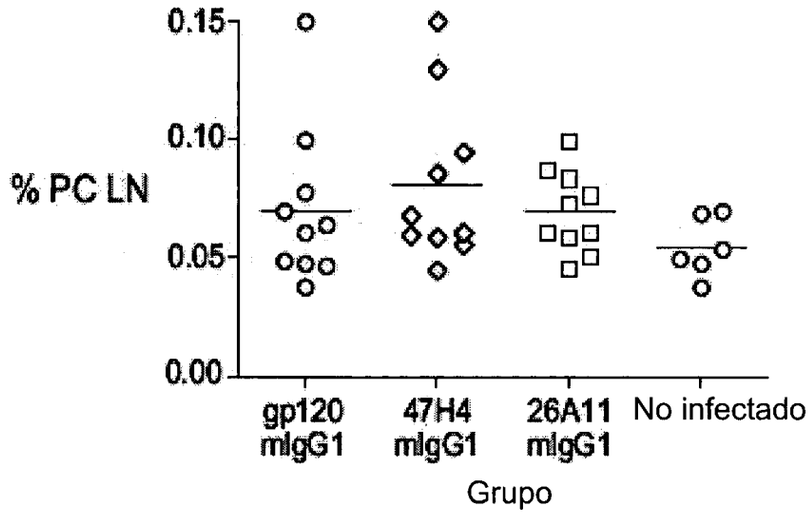
Efecto de Anti-IgE/M1' en Niveles IgE y Células que producen IgE



	Frecuencia Elispot IgE de Bazo			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	**9.9**	**5.3**	**na**	**na**
47H4 mIgG1	**4.2**	**3.4**	**-65.5%**	**0.0079***
26A11 mIgG1	**4.95**	**3.9**	**-56.9%**	**0.0229***
No inmunizado	1.2	1.3	-100%	**0.0004***

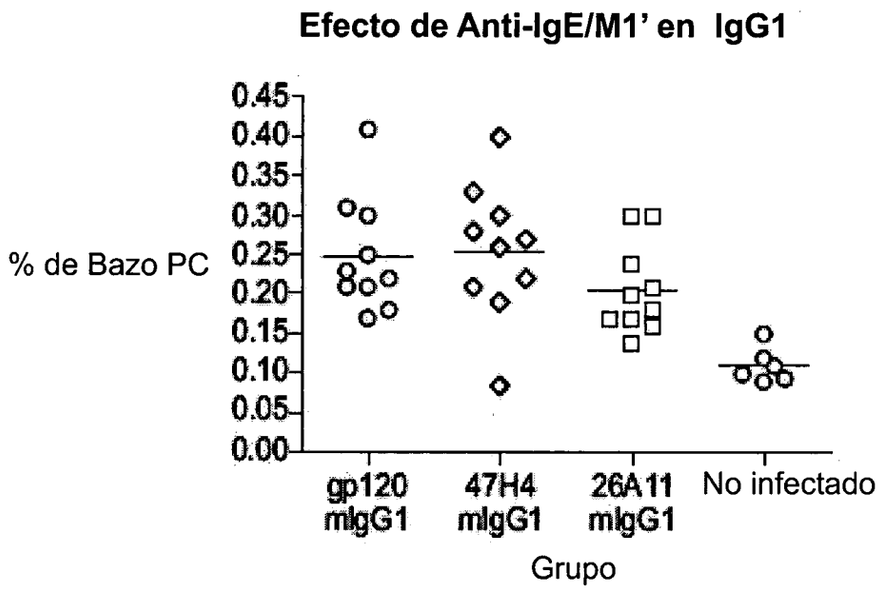
FIG. 18G

Efecto de Anti-IgE/M1' en IgG1



	Frecuencia PC Total LN			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	0.07	0.03	na	na
47H4 mIgG1	0.08	0.03	+50%	0.7377
26A11 mIgG1	0.07	0.02	0	1.0
No inmunizado	0.05	0.01	-100%	0.5596

FIG. 18H



	Frecuencia PC Total de Bazo			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio	valor p
gp120 mIgG1	0.25	0.07	na	na
47H4 mIgG1	0.25	0.09	0	0.9959
26A11 mIgG1	0.21	0.06	-28.6%	0.3839
No inmunizado	0.11	0.02	-100%	0.0010

FIG. 18I

Efecto Terapéutico en Producción de IgE Tardía de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

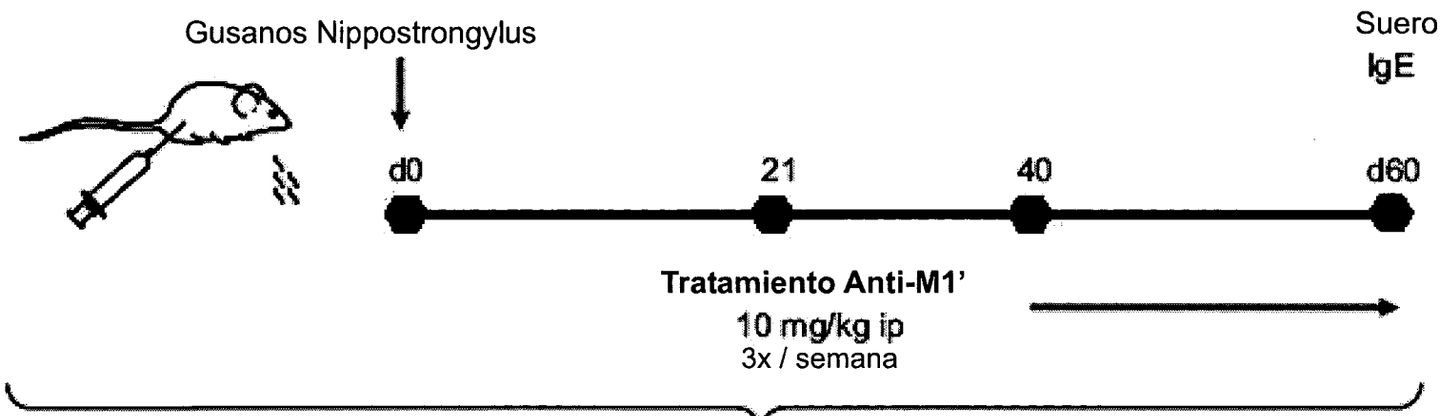


FIG. 19A

Efecto Terapéutico en Producción de IgE Tardía de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

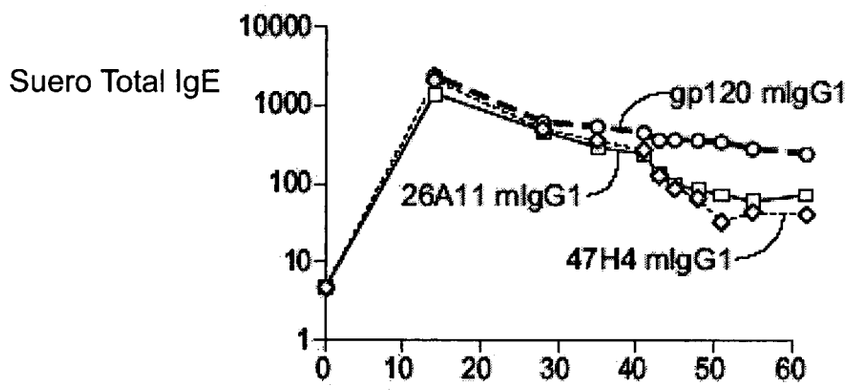


FIG. 19B

Efecto Terapéutico en Producción de IgE Tardía de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

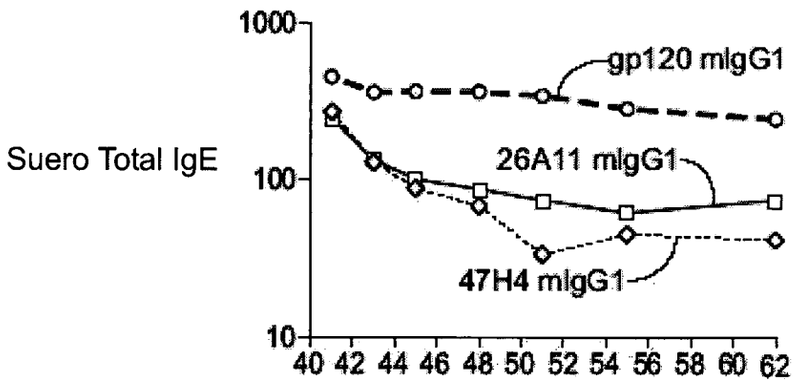


FIG. 19C

Efecto Terapéutico en Producción de IgE Tardía de Anticuerpos Anti-IgE/M1'

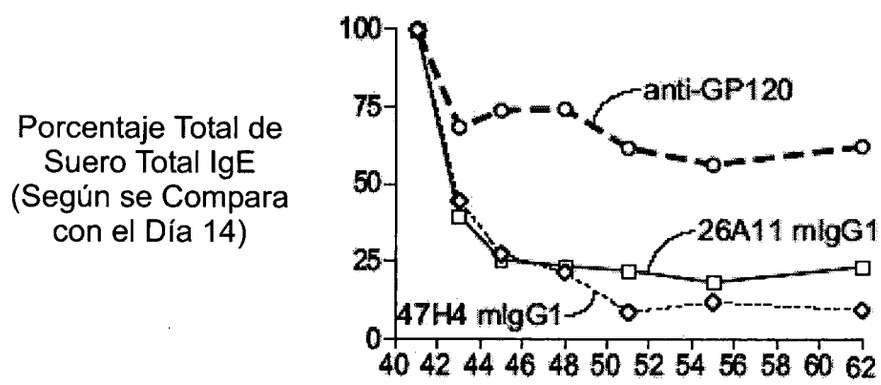
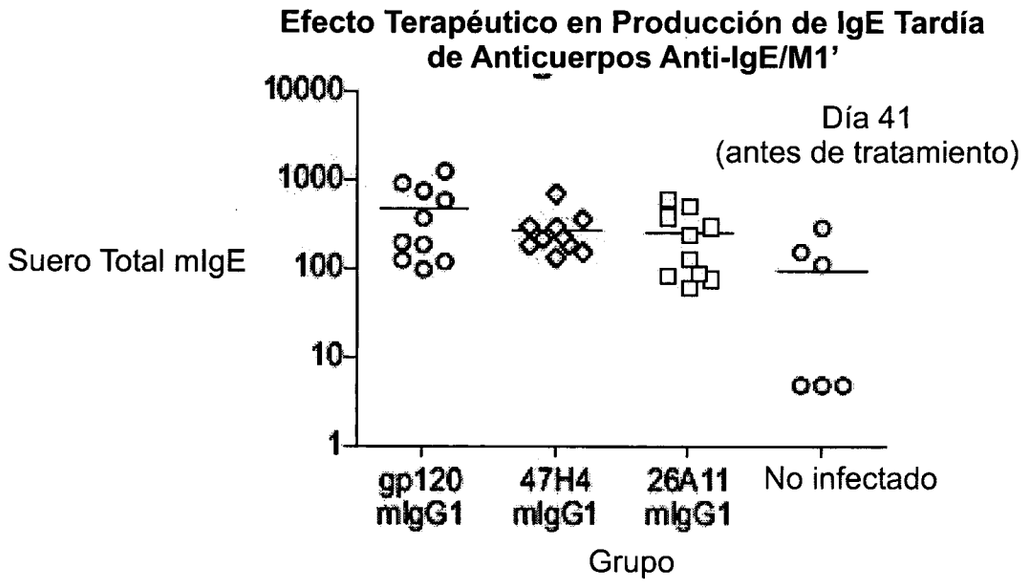


FIG. 19D

P2474R1

101 / 103

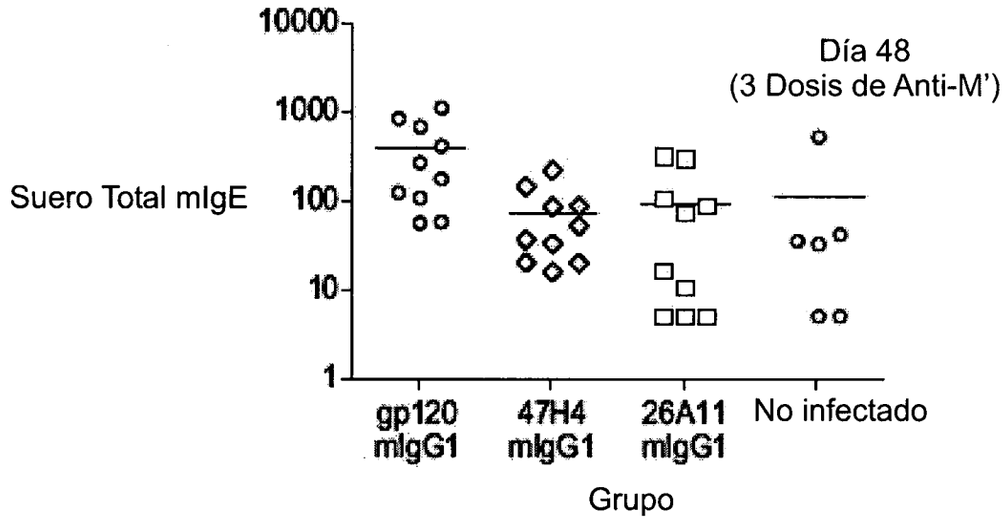


	Suero Total mIgE			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio (d41)	valor p (d41)
gp120 mIgG1	467.2	407.8	0	na
47H4 mIgG1	280.0	168.6	0	0.2738
26A11 mIgG1	252.3	201.8	0	0.1843
No infectado	97.6	116.9	0	0.0267*

* Estadísticamente significativo con Corrección de Bonferroni para comparación en forma de pares

FIG. 19E

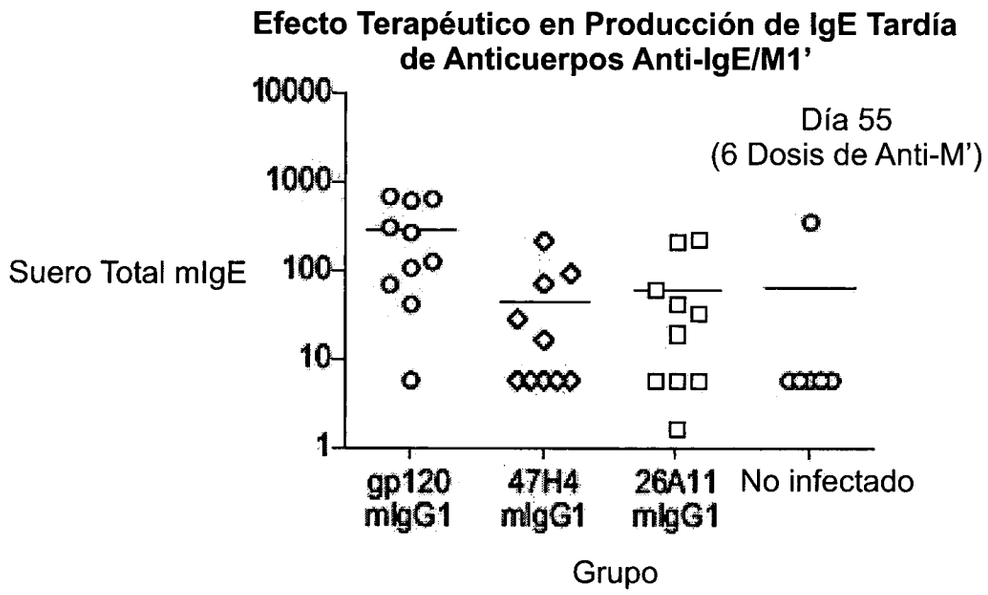
Efecto Terapéutico en Producción de IgE Tardía de Anticuerpos Anti-IgE/M1'



	Suero Total mIgE			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio (d41)	valor p (d41)
gp120 mIgG1	372.3	359.4	-20.3%	0.7715
47H4 mIgG1	69.8	64.2	-75.1%	0.0005*
26A11 mIgG1	89.7	115.5	-64.4%	0.0326*
No infectado	105.0	199.9	+7.6%	0.9938

* Estadísticamente significativo con Corrección de Bonferroni para comparación en forma de pares

FIG. 19F



	Suero Total mIgE			
Grupo	Medio	S.D.	% de Cambio (d41)	valor p (d41)
gp120 mIgG1	292.4	271.0	-37.4%	0.4401
47H4 mIgG1	46.3	68.4	-83.5%	0.0001*
26A11 mIgG1	63.3	89.3	-74.9%	0.0126*
No infectado	64.9	144.2	-33.5%	0.9158

* Estadísticamente significativo con Corrección de Bonferroni para comparación en forma de pares

FIG. 19G

P2474R1_SEQ_LISTING_IN_SPANISH
Listado de secuencias

<110> Genentech, Inc.
Wu, Lawren
Balazs, Mercedesz
Brightbill, Hans
Chan,Andrew C.
Chen, Yvonne Man-yee
Chuntharapai,Anan
Dennis, Mark
Wong, Terence

<120> Anticuerpos anti-IgE apoptóticos

<130> P2474R1 WO

<141> 2008-03-21

<150> Solicitud de Patente de EE.UU. 60/896.339
<151> 2007-03-22

<160> 112

<210> 1
<211> 431
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> IgE humano

<400> 1

```
Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro Pro Thr
  1               5                  10                  15

Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr Ile
             20                  25                  30

Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
             35                  40                  45

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
             50                  55                  60

Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
             65                  70                  75

Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu Asp Ser
             80                  85                  90

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr
             95                 100                 105

Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro
            110                 115                 120

Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr
            125                 130                 135

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His
            140                 145                 150

Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val
            155                 160                 165

Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu
            170                 175                 180

Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu
            185                 190                 195
```

```
Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu
                200                 205                 210

Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys
                215                 220                 225

Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile
                230                 235                 240

Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg
                245                 250                 255

His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe
                260                 265                 270

Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys
                275                 280                 285

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser
                290                 295                 300

Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala Gly
                305                 310                 315

Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His
                320                 325                 330

Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val
                335                 340                 345

Pro His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro
                350                 355                 360

Gly Pro Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu
                365                 370                 375

Ala Pro Trp Thr Trp Thr Gly Leu Cys Ile Phe Ala Ala Leu Phe
                380                 385                 390

Leu Leu Ser Val Ser Tyr Ser Ala Ala Leu Thr Leu Leu Met Val
                395                 400                 405

Gln Arg Phe Leu Ser Ala Thr Arg Gln Gly Arg Pro Gln Thr Ser
                410                 415                 420

Leu Asp Tyr Thr Asn Val Leu Gln Pro His Ala
                425                 430
```

<210> 2
<211> 432
<212> PRT
<213> Macaca mulatta

<220>
<221> Otro...

<223> IgE rhesus

<400> 2

```
 Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Asp Asp Gly His Phe Pro Pro Thr
   1               5                  10                  15

 Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ile Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Ala Ile
                20                  25                  30

 Asn Val Thr Trp Leu Glu Asn Gly Gln Val Met Lys Val Asn Ser
                35                  40                  45

 Pro Thr Pro Pro Ala Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
                50                  55                  60
```

Ser Glu Phe Thr Leu Ala Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
65 70 75

Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly Thr Thr Tyr Asn Asp Ser
80 85 90

Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr
95 100 105

Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Ser Lys Ser Pro
110 115 120

Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Glu Thr
125 130 135

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Pro His
140 145 150

Ile Pro Ala Thr Glu Lys Lys Gln Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr
155 160 165

Val Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Thr Gln Asp Trp Ile Glu Gly
170 175 180

Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala
185 190 195

Leu Val Arg Ser Met Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro
200 205 210

Glu Val Tyr Val Phe Ala Thr Pro Glu Lys Leu Glu Ser Arg Asp
215 220 225

Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp
230 235 240

Ile Ser Val Gln Trp Leu His Ser Asp Val Gln Leu Pro Asp Ala
245 250 255

Arg His Ser Val Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
260 265 270

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln
275 280 285

Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro
290 295 300

Ser Trp Ile Val Gln Gln Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala
305 310 315

Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys
320 325 330

His Ser Glu Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Arg Gly Ser
335 340 345

Val Pro Asp His His Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp
350 355 360

Pro Gly Leu Pro Glu Leu Asp Leu Cys Val Glu Glu Ala Glu Ser
365 370 375

Glu Val Leu Trp Thr Trp Thr Gly Leu Cys Ile Phe Ala Thr Leu
380 385 390

Phe Leu Leu Ser Val Ser Tyr Ser Ala Ala Ile Thr Leu Leu Met
395 400 405

Val Gln Arg Phe Leu Ser Ala Thr Arg Gln Gly Arg Pro Gln Thr
410 415 420

Ser Leu Asp Tyr Thr Asn Val Leu Gln Pro His Ala
425 430

<210> 3
<211> 431
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<220>
<221> Otro...

<223> IgE cyno

<400> 3
Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Asp Asp Gly His Phe Pro Pro Thr
1 5 10 15

Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ile Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Ala Ile
20 25 30

Asn Val Thr Trp Leu Glu Asn Gly Gln Val Met Lys Val Asn Ser
35 40 45

Pro Thr Pro Pro Ala Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln
50 55 60

Ser Glu Phe Thr Leu Ala Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr
65 70 75

Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly Thr Thr Tyr Asn Asp Ser
80 85 90

Thr Lys Lys Cys Ala Asn Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr
95 100 105

Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Ser Lys Ser Pro
110 115 120

Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Glu Thr
125 130 135

Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Pro His
140 145 150

Thr Pro Ala Thr Glu Lys Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val
155 160 165

Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Thr Gln Asp Trp Ile Glu Gly Glu
170 175 180

Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu
185 190 195

Val Arg Ser Met Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu
200 205 210

Val Tyr Val Phe Ala Thr Pro Glu Lys Leu Glu Ser Arg Asp Lys
215 220 225

Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile
230 235 240

Ser Val Gln Trp Leu His Ser Asp Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg
245 250 255

His Ser Val Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe Phe
260 265 270

Val Thr Ser Arg Leu Glu Val Thr Lys Ala Glu Trp Glu Gln Lys
275 280 285

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser

290 295 300

Trp Ile Val Gln Gln Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala Gly
305 310 315

Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His
320 325 330

Ser Glu Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Arg Gly Ser Val
335 340 345

Pro Asp His Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro
350 355 360

Gly Leu Pro Glu Leu Asp Leu Cys Val Glu Glu Ala Glu Ser Glu
365 370 375

Val Leu Trp Thr Trp Thr Gly Leu Cys Ile Phe Ala Thr Leu Phe
380 385 390

Leu Leu Ser Val Ser Tyr Ser Ala Ala Ile Thr Leu Leu Met Val
395 400 405

Gln Arg Phe Leu Ser Val Thr Arg Gln Gly Arg Pro Gln Thr Ser
410 415 420

Leu Asp Tyr Thr Asn Ile Leu Gln Pro His Ala
425 430

<210> 4
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Fragmento IgE humano

<400> 4
Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln Thr
1 5 10 15

Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala Gly Gly Ser
20 25 30

Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His Ser Gly
35 40 45

Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Pro His
50 55 60

Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro Gly Pro
65 70 75

Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Ala Pro
80 85 90

Trp Thr Trp Thr Gly Leu Cys Ile Phe Ala Ala Leu Phe Leu
95 100

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

<220>
<223> M1' péptido 1

<400> 5
Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1' péptido 2

<400> 6
Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1' peptide 3

<400> 7
Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg
1 5 10 15

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' peptide 4

<400> 8
Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His Ser
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1' peptide 5

<400> 9
Arg Ala Pro Asp Arg Val Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1 peptide 6

<400> 10
Val Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala
1 5 10 15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' peptide 7

<400> 11
Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Pro
1 5 10 15

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' peptide 8

<400> 12
Pro Arg Ala Ala Gly Gly Ser Val Pro His Pro Arg Cys His
5 10

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> M1' peptide 9

<400> 13
Gly Gly Ser Val Pro His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' péptido 10

<400> 14
His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro Gly
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1' péptido 11

<400> 15
Cys Gly Ala Gly Arg Ala Asp Trp Pro Gly Pro Pro Glu Leu Asp
1 5 10 15

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

<220>
<223> M1' peptide 12

<400> 16
Ala Asp Trp Pro Gly Pro Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' péptido 13

<400> 17
Pro Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Ala
1 5 10 15

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' peptide 14

<400> 18
Val Cys Val Glu Glu Ala Glu Gly Glu Ala Pro Trp Thr Trp Thr
1 5 10 15

<210> 19
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> M1' peptide 15

<400> 19
Ala Glu Gly Glu Ala Pro Trp Thr Trp Thr Gly Leu Cys Ile Phe
1 5 10 15

<210> 20
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera del anticuerpo kappa I humano

<400> 20
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 21
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 murino

<400> 21
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Asn Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Pro Val Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Leu Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 22
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 v 1,4 humanizado

<400> 22
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Asn Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 23
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 v2,5 humanizado

<400> 23
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Asn Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys

35 40 45

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 V3,6 humanizado

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 V13,15 humanizado

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Ser Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile

65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 26A11 V14,16 humanizado

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Asp Ile Ser
20 25 30

Gln Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

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

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

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Gly His Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg

<210> 27
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera del anticuerpo 7A6 murino

<400> 27
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
95 100 105

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 28
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 7A6 V.1 humanizado

<400> 28
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
65 70 75

Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
80 85 90

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
95 100 105

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 29
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera del anticuerpo 47H4 humanizado

<400> 29
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Phe Cys Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 30
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 47H4 V.1,3 humanizado

<400> 30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 31
<211> 113
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena ligera del anticuerpo 47H4 V.24-6 humanizado

<400> 31
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

His Asn Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 32
<211> 113
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada del anticuerpo III humano

<400> 32

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

<210> 33
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada del anticuerpo 26A11 murino

<400> 33

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

<210> 34
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo V.1-3,13,14 humanizado

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

Asp Tyr Tyr Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Tyr Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 26A11 V.4-6,15,16 humanizado

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Tyr Asp Thr Ser Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 36
<211> 122
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada del anticuerpo 7A6 murino

<400> 36

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

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

Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Thr Thr Ala Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Ala Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Arg Pro His Tyr Asp Tyr
95 100 105

Asp Asn Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 37
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 7A6 V.1 humanizado

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile
20 25 30

Asp Tyr Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Thr Thr Ala Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Arg Pro His Tyr Asp Tyr
95 100 105

Asp Asn Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
110 115 120

Ser Ser

<210> 38
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada del anticuerpo 47H4 murino

<400> 38
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
35 40 45

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Met Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 39
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 47H4 V.1,2 humanizado

<400> 39
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Met Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 40
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 47H4 V.3,4 humanizado

<400> 40
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

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

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 47H4 V.5 humanizado

<400> 41
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

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

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Met Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 42
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena pesada del anticuerpo 47H4 V.6 humanizado

<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr

50 55 60

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

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 43
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 7A6 murino

<400> 43
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

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

Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Thr Thr Ala Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Ala Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Arg Pro His Tyr Asp Tyr
95 100 105

Asp Asn Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
110 115 120

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
125 130 135

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
140 145 150

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
155 160 165

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
170 175 180

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
185 190 195

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
200 205 210

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
215 220 225

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
230 235 240

```
Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr
                245                 250                 255

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
                260                 265                 270

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
                275                 280                 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
                290                 295                 300

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
                305                 310                 315

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
                320                 325                 330

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
                335                 340                 345

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
                350                 355                 360

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
                365                 370                 375

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
                380                 385                 390

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
                395                 400                 405

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
                410                 415                 420

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
                425                 430                 435

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
                440                 445

<210> 44
<211> 220
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 7A6 murino

<400> 44
 Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val
   1               5                  10                  15

 Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu
                20                  25                  30

 Tyr Ser Thr Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
                35                  40                  45

 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
                50                  55                  60

 Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr
                65                  70                  75

 Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
                80                  85                  90
```

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
95 100 105

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
110 115 120

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
125 130 135

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
140 145 150

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
155 160 165

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
170 175 180

Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His
185 190 195

Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
200 205 210

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215 220

<210> 45
<211> 442
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 47H4 murino

<400> 45
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Asp Tyr Gly Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Pro
35 40 45

Glu Trp Val Ala Phe Ile Ser Asp Leu Ala Tyr Thr Ile Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Thr Val Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Glu Asn Ala
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Glu Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Trp Asp Ala Met Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
110 115 120

Thr Pro Pro Ser Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala
125 130 135

Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
140 145 150

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser
155 160 165

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr

170 175 180

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
185 190 195

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
200 205 210

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
215 220 225

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

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
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315

Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
320 325 330

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
335 340 345

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
350 355 360

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
365 370 375

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
380 385 390

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
395 400 405

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
410 415 420

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
425 430 435

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
440

<210> 46
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 47H4 murino

<400> 46
Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val
20 25 30

```
His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
                35                  40                  45

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

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
                65                  70                  75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
                80                  85                  90

Tyr Phe Cys Ser Gln Asn Thr Leu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly
                95                 100                 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
               110                 115                 120

Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
               125                 130                 135

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
               140                 145                 150

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
               155                 160                 165

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
               170                 175                 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
               185                 190                 195

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
               200                 205                 210

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
               215
```

<210> 47
<211> 436
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 26A11 murino

<400> 47

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

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

 Asp Tyr Tyr Met Met Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
                35                  40                  45

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

 Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser
                65                  70                  75

 Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp
                80                  85                  90

 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Lys Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
                95                 100                 105
```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Thr Pro Pro Ser Val
110 115 120

Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
125 130 135

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
140 145 150

Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe
155 160 165

Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val
170 175 180

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
185 190 195

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val
200 205 210

Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
215 220 225

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
230 235 240

Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
245 250 255

Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
260 265 270

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
275 280 285

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
305 310 315

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
320 325 330

Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu
335 340 345

Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
350 355 360

Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
365 370 375

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp
380 385 390

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn
395 400 405

Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly
410 415 420

Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
425 430 435

Lys

<210> 48
<211> 214
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 26A11 murino

<400> 48

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

Arg Asn Glu Cys

<210> 49
<211> 449
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 45C1 murino

<400> 49

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

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
50 55 60

Val Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser
65 70 75

Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp
80 85 90

Met Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile Tyr Tyr Asp Asn Asp
95 100 105

Asp Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ile Leu Thr Val Ser Ser Ala
110 115 120

Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
125 130 135

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly
140 145 150

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu
155 160 165

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu
170 175 180

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro
185 190 195

Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
200 205 210

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
215 220 225

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
245 250 255

Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
260 265 270

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
275 280 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
305 310 315

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu
320 325 330

Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
335 340 345

Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
350 355 360

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
365 370 375

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu
380 385 390

Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
395 400 405

Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
410 415 420

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
425 430 435

Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
440 445

<210> 50
<211> 219
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 45C1 murino

<400> 50
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
110 115 120

Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
140 145 150

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
155 160 165

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn
185 190 195

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile
200 205 210

Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215

<210> 51
<211> 446
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 28E9 murino

<400> 51

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr
             20                  25                  30

Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Pro Leu
             35                  40                  45

Glu Trp Leu Gly Phe Ile Ser Asn Lys Leu Asn Gly Tyr Thr Thr
             50                  55                  60

Glu Tyr Ser Ser Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
             65                  70                  75

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Pro
             80                  85                  90

Glu Asp Ser Ala Ala Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Met Val Pro Tyr
             95                 100                 105

Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ala Val
            110                 115                 120

Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro
            125                 130                 135

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu
            140                 145                 150

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
            155                 160                 165

Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
            170                 175                 180

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser
            185                 190                 195

Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala
            200                 205                 210

Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
            215                 220                 225

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe
            230                 235                 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr
            245                 250                 255

Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
            275                 280                 285

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
            290                 295                 300

Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
            305                 310                 315

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro
            320                 325                 330

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro
```

335 340 345

Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
350 355 360

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
365 370 375

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
380 385 390

Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
395 400 405

Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
410 415 420

Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His
425 430 435

Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
440 445

<210> 52
<211> 214
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 28E9 murino

<400> 52
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr
20 25 30

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

Leu Leu Val Tyr Asn Ala Gln Ile Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gln Phe Ser Leu Gln Ile
65 70 75

Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Tyr Tyr Tyr Cys Gln His
80 85 90

His Tyr Gly Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
110 115 120

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile
140 145 150

Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp
155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu
185 190 195

Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Asn Glu Cys

<210> 53
<211> 442
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 1C11 murino

<400> 53
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

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

Asp Phe Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Ala Pro Glu Thr Gly Thr Ser Ala Tyr
50 55 60

Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ile Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Tyr Tyr Ala Ala Pro Trp Phe
95 100 105

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
110 115 120

Thr Lys Gly Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala
125 130 135

Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
140 145 150

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser
155 160 165

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr
170 175 180

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser
185 190 195

Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
200 205 210

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys
215 220 225

Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
230 235 240

Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

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
290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315

Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
320 325 330

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
335 340 345

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu
350 355 360

Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
365 370 375

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln
380 385 390

Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu
395 400 405

Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
410 415 420

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
425 430 435

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
440

<210> 54
<211> 220
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 1C11 murino

<400> 54
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
20 25 30

Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
35 40 45

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr
65 70 75

Asp Phe Pro Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala
80 85 90

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly
95 100 105

Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr
110 115 120

Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

125 130 135

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
140 145 150

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val
155 160 165

Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
170 175 180

Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His
185 190 195

Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
200 205 210

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
215 220

<210> 55
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena pesada - H1

<400> 55
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 56
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena pesada - H2

<400> 56
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
5 10

<210> 57
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena pesada - H3

<400> 57
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 58
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena pesada - H4

<400> 58
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 59
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena ligera - L1

<400> 59
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena ligera - L2

<400> 60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 61
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena ligera - L3

<400> 61
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 62

<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Otro...

<223> Estructura de consenso humana de la región variable de la cadena ligera - L4

<400> 62
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 63
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso para clonación usado en el ejemplo 1

<400> 63
ccgcccaccg tgaagatctt acagtc 26

<210> 64
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso para clonación usado en el ejemplo 1

<400> 64
cggctcgaga ctaggcgtgg ggctggagga cgttg 35

<210> 65
<211> 542
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Fusión de IgE Ch3-Ch4-M'-Fc

<400> 65
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr
1 5 10 15

Gly Val His Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly
20 25 30

Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile
35 40 45

Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro
50 55 60

Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys
65 70 75

Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly
80 85 90

Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp
95 100 105

Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu
110 115 120

Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro Arg
125 130 135

Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
140 145 150

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met
155 160 165

Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu
170 175 180

Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly
185 190 195

Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu
200 205 210

Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala
215 220 225

Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro
230 235 240

Gly Leu Ala Gly Gly Ser Ala Gln Ser Gln Arg Ala Pro Asp Arg
245 250 255

Val Leu Cys His Ser Gly Gln Gln Gln Gly Leu Pro Arg Ala Ala
260 265 270

Gly Gly Ser Val Pro His Pro Arg Cys His Cys Gly Ala Gly Arg
275 280 285

Ala Asp Trp Pro Gly Pro Pro Glu Leu Asp Val Cys Val Glu Glu
290 295 300

Ala Glu Gly Glu Ala Pro Trp Arg Ala Gln Val Thr Asp Lys Ala
305 310 315

Ala His Tyr Thr Leu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
320 325 330

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
335 340 345

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
350 355 360

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
365 370 375

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
380 385 390

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
395 400 405

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
410 415 420

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
425 430 435

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
440 445 450

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
455 460 465

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
470 475 480

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
485 490 495

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
500 505 510

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
515 520 525

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
530 535 540

Gly Lys

<210> 66
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 7AG

<400> 66
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 67
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 7AG

<400> 67
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser
20 25

<210> 68
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 1C11

<400> 68
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 69
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 1C11

<400> 69
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser
20 25

<210> 70
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 47H4

<400> 70
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 71
<211> 21
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 47H4

<400> 71
Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile
20

<210> 72
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 26A11

<400> 72
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 73
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 26A11

<400> 73
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser
20 25

<210> 74
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 45C1

<400> 74
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Lys

<210> 75
<211> 24
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 45C1

<400> 75
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys
20

<210> 76
<211> 25
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena pesada 28E9

<400> 76
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser
20 25

<210> 77
<211> 24
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> Otro...

<223> Secuencia del extremo N terminal, cadena ligera 28E9

<400> 77
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Glu Thr Val Thr Phe Thr Cys Arg
20

<210> 78
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso FOR.BsiWI 7AG HC

<400> 78
tcgacgtacg ctcaggttca gctgcagcaa tctggggctg agctgg 46

<210> 79
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso FOR.EcoRV 7A6 LC

<400> 79
gatcgatatc gtgatgtccc agtctccctc ctccctaac 39

<210> 80
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso FOR.BsiWI 1C11 HC

<400> 80
tcgacgtacg ctcaggttca attgcagcag tctggggctg agctgg 46

<210> 81
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso FOR.EcoRV 1C11 LC

<400> 81
gatcgatatc gtaatgtctc agtctccttc ctccctagc 39

<210> 82
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 9.1HCF.BsiWI 47H4 HC

<400> 82
tcgacgtacg ctgaggtgaa gttggtggag tctgggggag gcttag 46

<210> 83
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 47H4LCF.EcoRV 47H4 LC

<400> 83
gatcgatatc gtgctgactc agactccact ctccctgcc 39

<210> 84
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador reverso C7F7HCF.BsiWI 26A11 HC

<400> 84
tcgacgtacg ctgaggtcca gctccagcag tctggacctg agc 43

<210> 85
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 2B4LCF.EcoRV 26A11

<400> 85
gatcgatatc cagatgaccc aaactacatc ctccctg 37

<210> 86
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 2G6HCF.BsiWI 45C1 HC

<400> 86
tcgacgtacg ctcagatcca gttggtgcag tctggacctg agctg 45

<210> 87
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 9C10LCF.EcoRV 45C1 LC

<400> 87
gatcgatatc gtgatgacgc agactccact cactttgtcg g 41

<210> 88
<211> 46
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 9.1HCFBsiWI 28E9 HC

<400> 88
tcgacgtacg ctgaggtgaa gctggtggag tctgaaggag gcttgg 46

<210> 89
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso 5E10.LCF.EcoRV 28E9 LC

<400> 89
gatcgatatc cagatgaccc agtctccagc ctccctatc 39

<210> 90
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de la cadena pesada (HCR)

<400> 90
ctggacaggg atccagagtt ccaggtcact gtcactggct caggg 45

<210> 91

<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de la cadena ligera (LCR)

<400> 91
ctgtaggtgc tgtctttgct gtcctgatca gtccaactg 39

<210> 92
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso REV.ApaI 7A6 HC

<400> 92
accgatgggc ccttggtgga ggctgaagag actgtgag 38

<210> 93
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso REV.KpnI 7A6 LC

<400> 93
ccttggtacc ccctccgaac gtgtacggat agctataata ttg 43

<210> 94
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso REV.ApaI 1C11 HC

<400> 94
gaccgatggg cccttggtgg aggctgagga gactgtg 37

<210> 95
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso REV.KpnI 1C11 LC

<400> 95
ccttggtacc ccctccgaac gtgtacggat agctataa 38

<210> 96
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 47H4HCR.ApaI 47H4 HC

<400> 96
tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gactgag 37

<210> 97
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 47H4LCR.KpnI 47H4 LC

<400> 97
ttccaacttg gtacctccac c 21

<210> 98
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 7G8HCR.ApaI 26A11 HC

<400> 98
gaccgatggg cccttggtgg argctgcaga gacagtgacc agag 44

<210> 99
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 47H4LCR.KpnI 26A11 LC

<400> 99
ttccaacttg gtacctccac c 21

<210> 100
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 45C1HCR.ApaI 45C1 HC

<400> 100
cgatgggccc ttggtggarg ckgaggagac ggtgagaatg 40

<210> 101
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 5C2LCR.KpnI 45C1 LC

<400> 101
agcttggtac cccctccg 18

<210> 102
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 28E9.HC.REV.ApaI 28E9 HC

<400> 102
cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggcgactgag 40

<210> 103
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso 1D5.2LCR,KpnI 28E9 LC

<400> 103
ttccaacttg gtacccgagc cg 22

<210> 104
<211> 33

<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 104
cctatttaca ttggtatctg cagaagccag gcc 33

<210> 105
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso para mutagénesis

<400> 105
ggcctggctt ctgcagatac caatgtaaat agg 33

<210> 106
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso de tipo natural para detección de M1'

<400> 106
ggccaaagac cctaagacag tc 22

<210> 107
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso huM1' para detección de M1'

<400> 107
gggctggctg gcggctccgc 20

<210> 108
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso de tipo natural para detección de M1'

<400> 108
ctatgccctg gtctggaaga tg 22

<210> 109
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso del brazo izquierdo

<400> 109
tgtctggtgg tggacctgga aagcg 25

<210> 110
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso del brazo izquierdo

<400> 110
tcctcgctct cctcctctgg tggtg 25

<210> 111
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador anverso del brazo derecho

<400> 111
ccatgcaacc tagtatccta ttctc 25

<210> 112
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador reverso del brazo derecho

<400> 112
ctttatacag gagaacctag cccag 25

111 401

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P2474R1 WO	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/US2008/057819	International filing date *(day/month/year)* 21.03.2008	Priority date *(day/month/year)* 22.03.2007
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/42		
Applicant Genentech, Inc.		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☒ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of 4 sheets, as follows:
      ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:
   - ☒ Box No. I Basis of the report
   - ☐ Box No. II Priority
   - ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
   - ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - ☐ Box No. VI Certain documents cited
   - ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
   - ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
2008-12-18	08.06.2009
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized officer Le Flao, Katell Telephone No. +31 70 340-1040

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2008/057819

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
- ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
- ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-158	as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1-32	as originally filed

Claims, Numbers

1-58	as originally filed

Drawings, Sheets

1/103-47/103, 49/103, 50/103, 53/103-84/103, 86/103-103/103	as originally filed
48/103, 51/103, 52/103, 85/103	filed with telefax on 18.12.2008

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify)*:
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2008/057819

6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) have been received and taken into account in drawing up this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	10-13,18-21,24-58
	No:	Claims	1-9,14-17,22,23
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	10-13,18-21,24-31,38-42,48,56-58
	No:	Claims	1-9,14-17,22,23,32-37,43-47,49-55
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-58
	No:	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2008/057819

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ on paper

   ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

   ☒ contained in the international application as filed

   ☒ filed together with the international application in electronic form

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2008/057819

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Claims 37-55 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 39.1(iv) / 67.1(iv) PCT. The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Reference is made to the following documents:

D1: CHEN H Y ET AL, XP008083849
D2: CHANG TSE WEN, XP008083904
D3: CHEN HUAN YUAN ET AL, XP008095920
D4: POGGIANELLA MONICA ET AL, XP002494041
D5: TUMAS D B ET AL, XP002494042
D6: INFÜHR D ET AL, XP002494043

D1 discloses the generation of five CepsilonmX specific monoclonal antibodies (mAbs) by immunizing mice with a CepsilonmX-containing IgG1.Fc fusion protein. All five mAbs recognize the same epitope, RADWPGPP (see the abstract).

D2 discloses the sequence of the CepsilonmX domain ie the domain comprising the 52 amino acids which is located between the CH4 domain and the C-terminal membrane anchoring peptide (page S12 and Figure 2) and presents it, in combination with migis-epsilon, as a unique site for immunologic targeting of mIgE-expressing B cells.

D3 discloses the generation of the mAbs as in the invention, ie antibodies binding the epsilonm67 made of the 52 aa -long domain, which is between the membrane anchoring peptide and the CH4 domain and of the 15 aa -long domain exterior segment of the membrane anchor. An IgG1.Fcepsilonm67 fusion protein has been prepared in which epsilonm67 exists as a dimer resembling the native conformation and used to immunize mice.

Seven mAbs have been isolated (see the abstract).

D4 reports that the extracellular membrane proximal domain (EMPD) of human mIgE is involved in apoptosis (abstract).

NOVELTY

Antibodies disclosed in D1 and D3 are specifically binding the M1' segment of IgE, designed CepsilonmX domain in the prior art. They are able to cause complement-mediated cytotoxicity (see the respective abstracts). It has not been reported whether they are inducing apoptosis or not. Considering it may be one of their features, the antibodies of D1 and D3 are anticipating the antibodies as claimed. Claims 1-9, 14-17, 22, 23 are therefore not novel.

INVENTIVE STEP

Claims 32-37, 43-47 and 49-55 are not considered to involve an inventive step for the following reasons.

The dependent claims 32-36 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of claim 22, involve an inventive step as the relevant subject matter falls within the knowledge and ability of the skilled person.

Claims 37, 43-47 and 49-55 relate to therapeutical use of anti IgE antibodies binding the CpesilonmX domain. The closest prior for these claims is considered to be the known treatment of allergic patients with anti IgE antibodies which showed nearly complete depletion of free IgE (cf D1, page 316, left-hand column, §2).

Claim 37 differs in that the antibodies induce apoptosis in IgE expressing B-cells. The technical problem to be solved is thus to provide an alternative treatment characterized in IgE-producing B-cells depletion. The problem is solved. The claim is however not inventive since the solution amounts in elucidating a mechanism of action and is defined in terms of result to be achieved. The same applies to claims 43-47 and 49-55.

Claims 10-13, 18-21, 24-31, 38-42, 48 and 56-58 are involving an inventive step.

Claims 10-12 relate to the specific antibodies of the invention. They differ from the prior art

D1 or D3 by characterising the antibodies with either the specific hybridomas (claim 10) or with the epitopes they bound. The effect of the difference is that these antibodies are inducing apoptosis. The problem to be solved is the provision of alternative antibodies binding the CepsilonmX domain of mIgE. The problem is solved and is involving an inventive step. There is indeed no suggestion to arrive to these specific hybridomas, even if D4 reports that the extracellular membrane proximal domain (EMPD) of human mIgE is involved in apoptosis (abstract).

D2, considered as the closest prior art to claim 13, discloses the 52 aa -long CepsilonmX domain of the membrane epsilon chain (cf page S12 and Figure 2). Claim 13 differs in that it relates to some parts of the peptide which are the epitopes bound by the mAbs of the invention. The problem to be solved is considered to be the identification of the parts of the peptide allowing the binding to relevant antibodies. Considering D1 reports that the mAbs anti CepsilonmX are binding the epitope RADWPGPP, which is a different part of the peptide, there is no incentive to arrive to the claimed solution.

Claims 18-21, 24-31, 38-42, 48 and 56-58 are also involving an inventive step.

Re Item VIII

CLARITY

The M1' designation for the 52 aa -long peptide corresponding to the domain of mIgE which is between the membrane anchoring peptide and the CH4 domain is different than the terminology used in the prior art, which is either extracellular membrane proximal domain (EMPD) or CepsilonmX domain. This inconsistence should be avoided to meet the requirements of clarity (Art. 6 PCT).

The use of the internal designations 47H4, 7A6, 26A11, 47H4v5, 7A6v1 and 26A11v6 in claims 10, 18-20, 24, 25, 38 and 48 is not fulfilling the requirements of clarity of Art.6 PCT. The complete designation of the hybridomas would overcome the objection.

It is clear from the description on pages 122, 128-130, 133 that the features of claim 10 are essential to the definition of the invention.

Since independent claims 1, 3, 14, 16, 18, 37, 43, 50, 51, 54-56 and 58 do not contain these features they do not meet the requirement following from Article 6 PCT taken in combination with Rule 6.3(b) PCT that any independent claim must contain all the technical features essential to the definition of the invention.

7A6 - VL

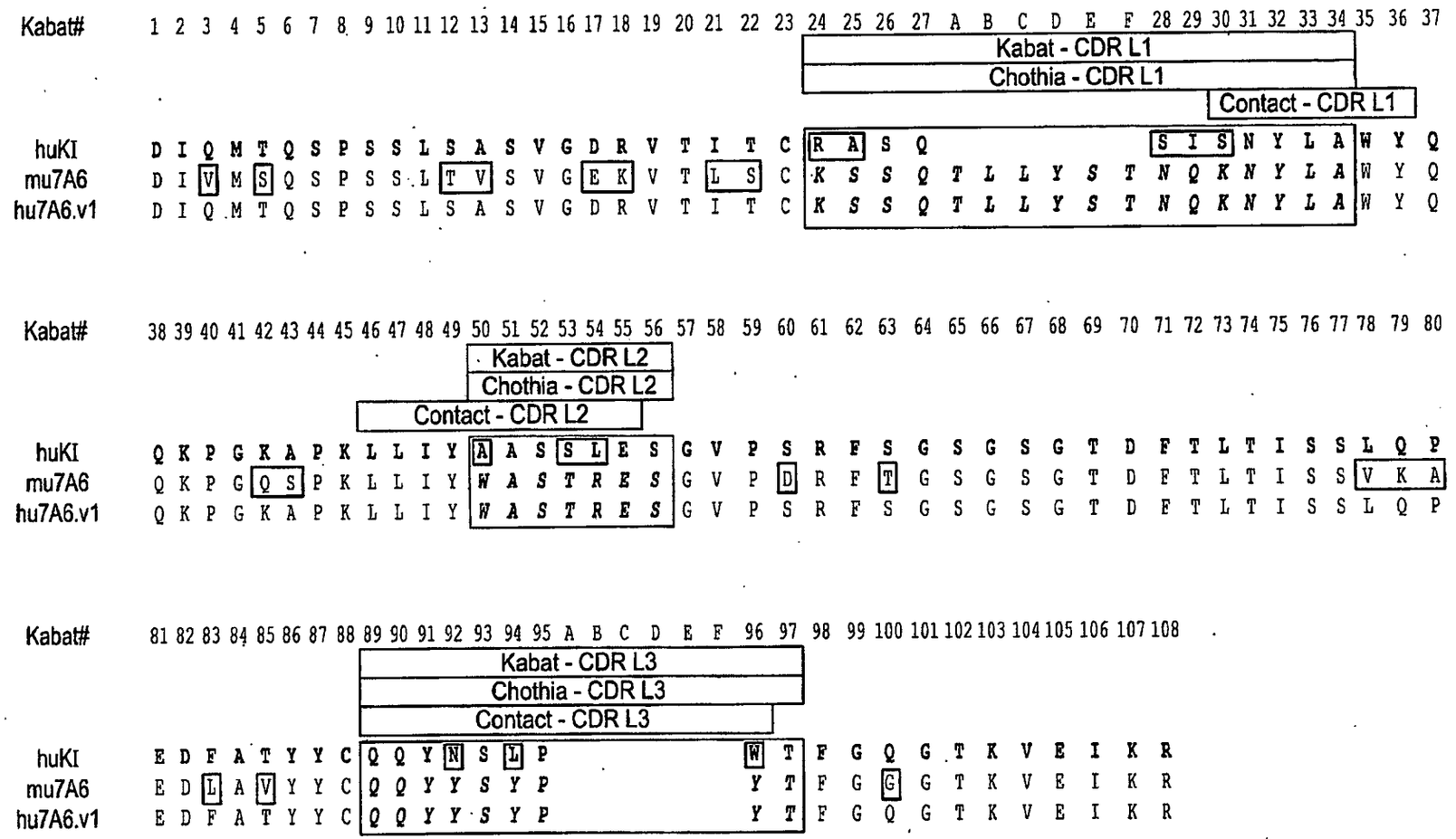

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 A B C D E F 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37
Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contact - CDR L1
huKI D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S N Y L A W Y Q
mu7A6 D I V M S Q S P S S L T V S V G E K V T L S C K S S Q T L L Y S T N Q K N Y L A W Y Q
hu7A6.v1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q T L L Y S T N Q K N Y L A W Y Q
Kabat#
38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contact - CDR L2
huKI Q K P G K A P K L L I Y A A S S L E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
mu7A6 Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S S V K A
hu7A6.v1 Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
Kabat#
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contact - CDR L3
huKI E D F A T Y Y C Q Q Y N S L P W T F G Q G T K V E I K R
mu7A6 E D L A V Y Y C Q Q Y Y S Y P Y T F G G G T K V E I K R
hu7A6.v1 E D F A T Y Y C Q Q Y Y S Y P Y T F G Q G T K V E I K R

FIG. 6B

7A6 - VH

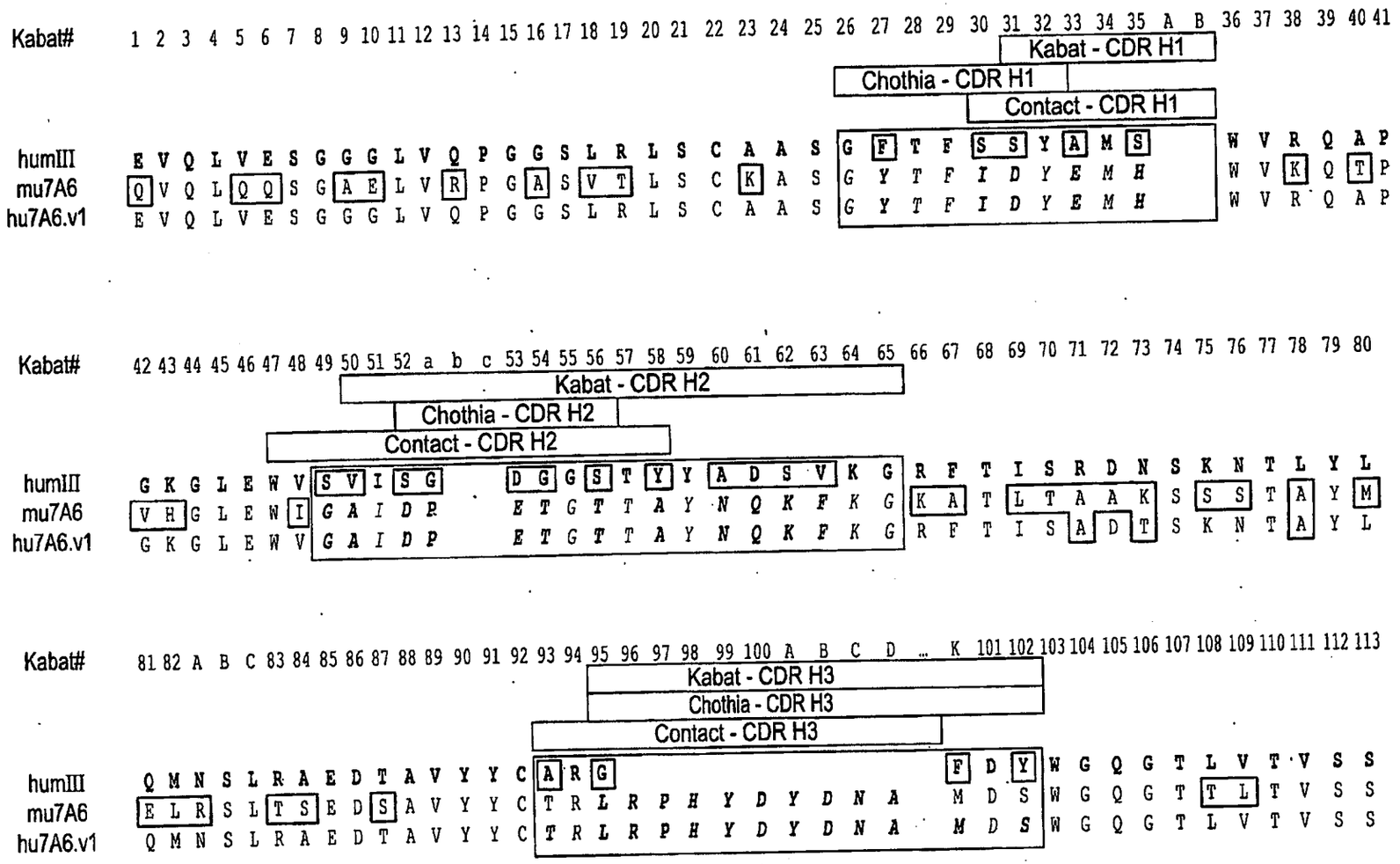

Kabat#
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 A B 36 37 38 39 40 41
Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contact - CDR H1
humIII E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P
mu7A6 Q V Q L Q Q S G A E L V R P G A S V T L S C K A S G Y T F I D Y E M H W V K Q T P
hu7A6.v1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y T F I D Y E M H W V R Q A P
Kabat#
42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 a b c 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contact - CDR H2
humII G K G L E W V S V I S G D G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L
mu7A6 V H G L E W I G A I D P E T G T T A Y N Q K F K G K A T L T A A K S S S T A Y M
hu7A6.v1 G K G L E W V G A I D P E T G T T A Y N Q K F K G R F T I S A D T S K N T A Y L
Kabat#
81 82 A B C 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 A B C D ... K 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contact - CDR H3
humIII Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G F D Y W G Q G T L V T V S S
mu7A6 E L R S L T S E D S A V Y Y C T R L R P H Y D Y D N A M D S W G Q G T T L T V S S
hu7A6.v1 Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R L R P H Y D Y D N A M D S W G Q G T L V T V S S

FIG. 6E

47H4 - VH

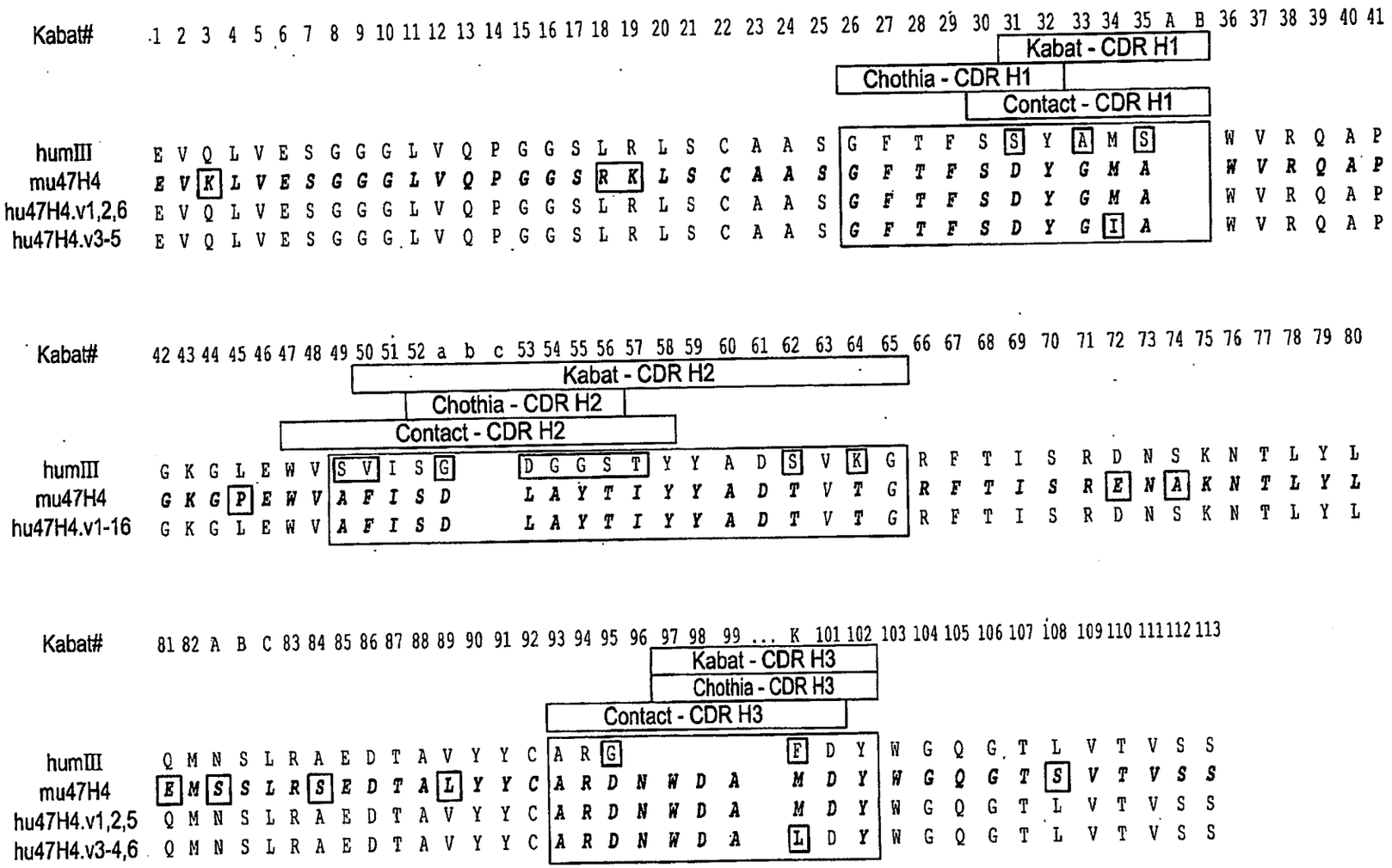


FIG. 6F

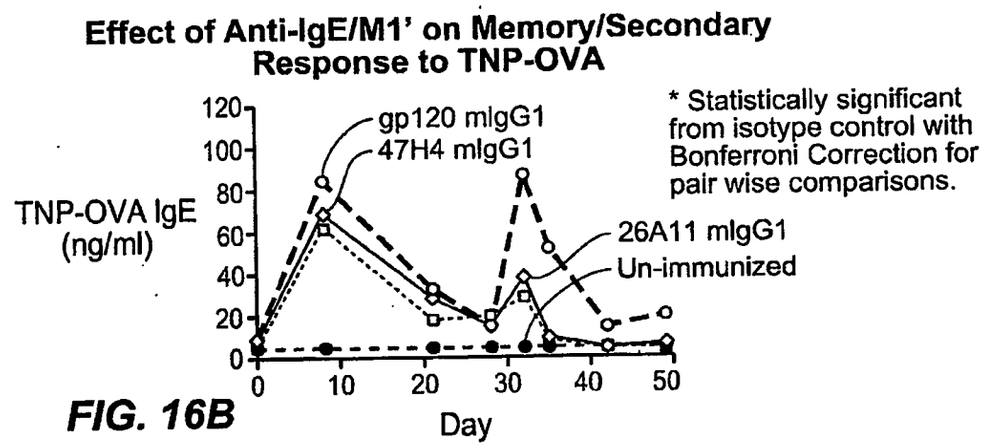


FIG. 16B

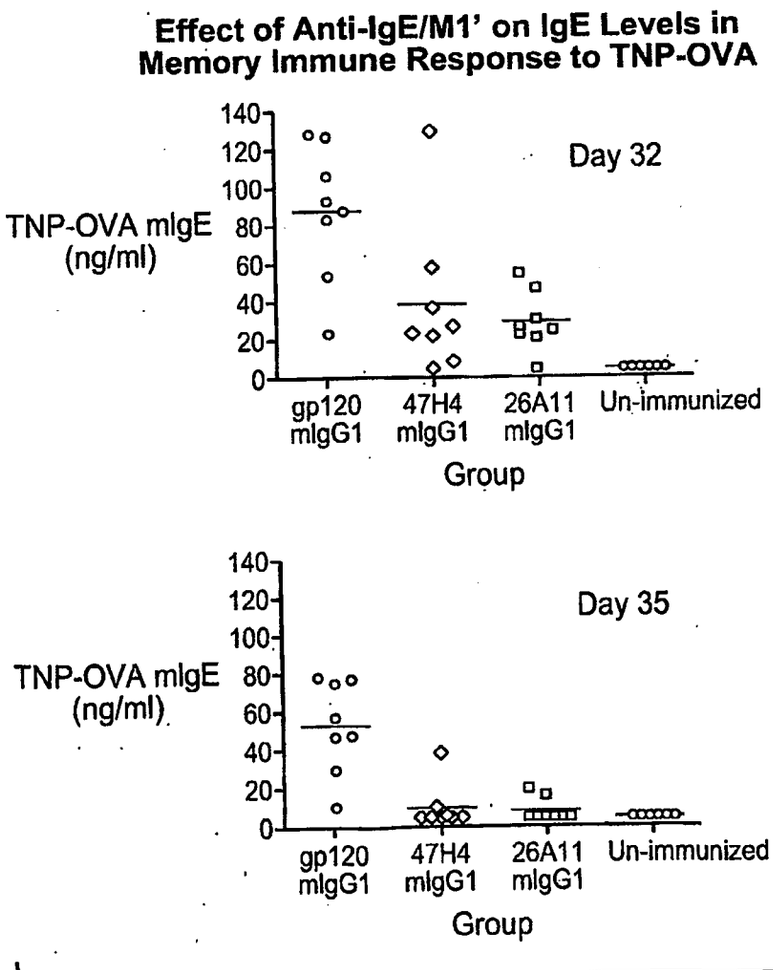


FIG. 16C

307

TRATADO SOBRE COOPERACIÓN EN PATENTES

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(Capítulo II del tratado sobre cooperación en Patentes)

(Artículo 36 y Regla 70 PCT)

Expediente de Referencia del Solicitante o Agente		
P2474R1 WO	**PARA PROCEDIMIENTO POSTERIOR**	Véase la notificación de transmisión del informe de examen preliminar Internacional (Forma PCT/IPEA/416)

Solicitud Internacional No.	Fecha de Solicitud Internacional *(día/mes/año)*	Fecha Prioridad *(día/mes/año)*
PCT/US2008/057819	21.03.2008	22.03.2007

Clasificación Internacional de Patente (IPC) o Clasificación Nacional e IPC
INV. C07K16/42

Solicitante
Genentech, Inc.

1. Este informe de examen preliminar internacional fue elaborado por la Oficina Encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante según el Artículo 36.

2. Este INFORME comprende un total de **8** hojas, incluyendo esta portada

3. Este informe también está acompañado de ANEXOS que comprenden:

   a. ☒ Enviadas al solicitante y a la oficina internacional un total de 4 hojas como sigue:

   ☒ Hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver regla 70.16 y Sección 607 de las instrucciones Administrativas)

   ☐ Hojas que sustituyen hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de lo dispuesto en la solicitud internacional como fue presentada, como indicado en el punto 4 de la Caja No. 1 y la Caja Suplementaria.

   b. ☐ (enviado solamente a la Oficina internacional) un total de (indicar el tipo y número de transportador(es) electrónico(s), que contienen una secuencia de lista y/o tablas relacionadas a estas, en forma electrónica solamente, como indicado en la Caja Suplementaria Relacionando a la Secuancia de Lista (ver Sección 802 de las instrucciones Administrativas)

4. Este informe contiene datos con respecto a los siguientes puntos:

I.	☒	Bases de la opinión
II.	☐	Prioridad
III.	☐	Sin elaboración de un dictamen sobre novedad, actividad inventiva y posibilidad de aplicación industrial
IV.	☐	Uniformidad deficiente de la invención
V.	☒	Declaración justificada según la Regla 66.2(a)(ii) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan esta declaración
VI.	☐	Ciertos documentos citados
VII.	☐	Ciertas deficiencias del registro internacional
VIII.	☒	Ciertas observaciones relacionadas con la solicitud internacional

Fecha de presentación de la petición	Fecha de la preparación de este informe
18.12.2008	08.06.2009
Nombre y dirección de correspondencia de la IPEA/AT	Funcionario Autorizado
Oficina de Patentes Europea NL-2280 HV Rijswijk – Pays Bas Tel. +31 70 340 2040 Fax No. +31 70 340 3016	**Le Flao, Katell** Teléfono No. +31 70 340 1040

304

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2008/057819

I. Bases de este informe.

1 Con respecto al **idioma**, este reporte se basa en
☒ la solicitud internacional en el lenguaje en que fue solicitada

☐ búsqueda internacional (bajo reglas 12.3(a) y 23.1(b))

☐ publicación de la solicitud internacional (bajo regla 12.4(a))

☐ examen preliminar internacional (bajo reglas 55.2(a) y/o 55.3(a))

2 Con respecto a los **elementos*** de la solicitud internacional, este informe se basa en *(hojas de reemplazo que se han suministrado a la Oficina receptora en respuesta a una invitación bajo Artículo 14 se tienen en este informe por "presentadas originalmente" y no se anexan a este informe ya que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17)):*

Descripción, páginas

1-158 como fue presentada inicialmente

Listas de Secuencia que hacen parte de la descripción

1-32 como fue presentada inicialmente

Reivindicaciones, No.

1-58 como fue presentada inicialmente

Dibujos, hojas

1/103-47/103, 49/103, 50/103 como fue presentada inicialmente

53/103-84/103, 86/103-103/103

48/103, 51/103, 52/103, 85/103 presentadas con telefax el 18.12.2008

☒ una secuancia de lista y/o cualquier tabla(s) relacionada(s) – ver caja Suplementaria Relacionando a Secuencia de Lista

3 ☐ Las modificaciones han resultado en la cancelación de:
- ☐ La descripción, páginas
- ☐ Las reivindicaciones, Nos.
- ☐ Los dibujos, hojas/figuras
- ☐ Las secuencias de lista (especificar):
- ☐ Alguna(s) tabla(s) relacionadas con la secuencia de lista (especificar)

4 ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas de) las modificaciones anexas a este reporte y listadas abajo no hayan sido realizadas, desde que ellas han sido consideradas por ir más allá de lo revelado como fue presentado, como se indica en la caja Suplementaria (Regla 70.2(c)).
- ☐ La descripción, páginas
- ☐ Las reivindicaciones, Nos.
- ☐ Los dibujos, hojas/figuras
- ☐ Las secuencias de lista (especificar):
- ☐ Alguna(s) tabla(s) relacionadas con la secuencia de lista (especificar)

5 ☐ Esta opinión ha sido establecida tomando en cuenta la **rectificación de un error obvio** autorizado por o notificado a esta Autoridad bajo la Regla 91 (Regla 70.2 (e))

6 ☐ Reporte(s) de búsqueda internacional de Autoridad(es) han sido recibidas y tomadas en cuenta para realizar este reporte (Regla 45bis.8(b) y (c))

V. Declaración concluyente de acuerdo a el Artículo 35(2) con relación a la novedad, el nivel inventivo o la aplicabilidad industrial; citas y explicaciones apoyando esta declaración

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones	10-13, 18-21, 24-58
	No:	Reivindicaciones	1-9, 14-17, 22, 23
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones	10-13, 18-21, 24-31, 38-42, 48, 56-58
	No:	Reivindicaciones	1-9, 14-17, 22, 23, 32-37, 43-47, 49-55
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones	1-58
	No:	Reivindicaciones	

2. Citas y explicaciones (Regla 70.7):
Ver hoja separada

VIII. Algunas observaciones sobre la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta si las reivindicaciones están completamente soportadas por la descripción, son realizadas:

Ver hoja separada

INFORME DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2008/057819

Caja Suplementaria relacionando a Secuencia de Lista

Continuación de Caja 1, punto 2:

1. En relación a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, este reporte fue establecido con la base de:

a. tipo de material:
- ☒ Una secuencia de lista
- ☐ Tabla(s) relacionada(s) a la secuencia de lista

b. formato del material:
- ☒ En papel
- ☒ En forma electrónica

c. tiempo de presentación:
- ☒ contenido en la solicitud internacional como fue presentada
- ☒ presentado junto con la solicitud internacional de manera electrónica
- ☐ Suministrada subsecuentemente a esta Autoridad para propósitos de búsqueda y/o examen
- ☐ Recibido por esta Autoridad como una modificación*

2. ☐ Adicionalmente, en caso que mas de una versión o copia de una secuencia de lista y/o tabla(s) relacionando a estas hayan sido presentadas, las declaraciones requeridas que la información en las subsecuentes o adicionales copias son idénticas a aquellas en la solicitud tal como presentada o no van más allá de la solicitud como presentada, como apropiadamente, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

** Si el punto 4 en la Caja no. 1 aplica, la lista y/o la(s) tabla(s) relacionada(s) con esta(s), que forman parte de la base del reporte, pueden ser macadas "sustituidas"*

Re Punto V

Declaración razonada con relación a novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

Las reivindicaciones 37-55 se relacionan con materia considerada por esta Autoridad a ser cubierta por las provisiones de la Regla 39.1(iv) PCT. La patentabilidad puede ser dependiente de la formulación de estas reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como patentables reivindicaciones al uso de un compuesto en tratamientos médicos, pero puede permitir reivindicaciones a un producto, en particular sustancias o composiciones para uso en un primer o adicional tratamiento médico.

Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: CHEN H Y ET AL, XP008083849

D2: CHANG TSE WEN, XP008083904

D3: CHEN HUAN YUAN ET AL, XP008095920

D4: POGGIANELLA MONICA ET AL, XP002494041

D5: TUMAS D B ET AL, XP002494042

D6: INFÜHR D ET AL, XP002494043

D1 revela la generación de 5 anticuerpos monoclonales específicos CepsilonmX (mAbs) mediante inmunizar ratones con una proteina de fusión IgG1.Fc que contiene CepsilonmX. Todos los cinco mAbs reconocen el mismo epitope, RADWPGPP (ver el resumen).

D2 revela la secuencia del dominio del CepsilonmX, esto es el dominio que comprende los 52 aminoácidos que está localizado entre el dominio CH4 y la membrana sujetadora de péptidos C-terminal (página S12 y figura 2) y la presenta, en combinación con migis-epsilon, como un único sitio para dirección inmunológica de las células B muge-expresantes.

D3 revela la generación de mAbs como en la invención, esto es anticuerpos uniendo el epsilonm67 hecho del dominio largo 52 aa, que está entre la membrana sujetadora de péptidos y el dominio CH4 y el segmento del dominio largo exterior 15 aa del sujetador de membrana. Una proteína de fusión IgG1.Fcepsilonm67 ha sido preparada donde epsilonm67 existe como un dímero que se asemeja a la conformación nativa y utilizada para inmunizar ratones. Siete mAbs han sido aislados (ver el resumen).

D4 reporta que el dominio proximal de membrana extracelular (EMPD) de humano mIgE está involucrada en la apoptosis (resumen)

NOVEDAD

Los anticuerpos revelados en D1 y D3 están específicamente uniendo el segmento M1' de IgE, el dominio CepsilonmX diseñado en el arte previo. Son capaces de causar citotoxicidad complemento-mediada (ver respectivos resúmenes). No ha sido reportado si ellos están induciendo apoptosis o no. Considerando que puede ser una de sus características, los anticuerpos de D1 y D3 están anticipando los anticuerpos como se reivindican. Entonces las reivindicaciones 1-9, 14-17, 22 y 23 no son nuevas.

NIVEL INVENTIVO

Las reivindicaciones 32-37, 43-47 y 49-55 no se considera que involucren un paso inventivo por las siguientes razones.

Las reivindicaciones dependientes 32-36 no parecen contener características adicionales las cuales, en combinación con las características de la reivindicación 22, involucren un paso inventivo ya que la materia relevante cae entre el conocimiento y habilidad de la persona entrenada en la materia.

Las reivindicaciones 37, 43-47 y 49-55 se relacionan al uso terapéutico de anticuerpos anti IgE uniendo el dominio CepsilonmX. Lo mas cercano anterior para estas reivindicaciones es considerado ser el conocido tratamiento de pacientes alérgicos con anticuerpos anti IgE que mostraron cerca de un agotamiento completo de IgE libre (cf D1, página 316, columna izquierda, §2).

La reivindicación 37 difiere en que los anticuerpos inducen apoptosis en las células B IgE expresantes. El problema técnico a ser resuelto es entonces proveer un tratamiento alternativo caracterizado por el agotamiento de producción de células B IgE. El problema es solucionado. La reivindicación sin embargo no es inventiva ya que las cantidades de solución en elucidar un mecanismo de acción y está definido en términos de un resultado a alcanzar. Lo mismo aplica a las reivindicaciones 43-47 y 49-55.

Las reivindicaciones 10-13, 18-21, 24-31, 38-42, 48 y 56-58 involucran un paso inventivo.

Las reivindicaciones 10-12 se relacionan con los anticuerpos específicos de la

invención. Ellos difieren del arte previo D1 o D3 en caracterizar los anticuerpos con ya sea los hibridomas específicos (reivindicación 10) o con los epitopes que ellos unen.

El efecto de la diferencia es que estos anticuerpos están induciendo apoptosis. El problema a ser resuelto es la provisión de anticuerpos alternativos que unen el dominio CepsilonmX de mIgE. El problema es resuelto e involucra un paso inventivo.Verdaderamente no hay sugerencia para llegar a estos hibridomas específicos, incluso si D4 reporta que el dominio proximal de membrana extracelular (EMPD) de mIgE humano se involucra en la apoptosis (resumen).

D2, considerado el arte previo más cercano a la reivindicación 13, revela el dominio largo CepsilonmX – 52 aa de la cadena de membrana Epsilon (cf página S12 y Figura 2). La reivindicación 13 difiere en que se relaciona con algunas partes del péptido que son los epitopes unidos por el mAbs de la invención. El problema a ser resuelto se considera ser la identificación de las partes del péptido que permiten la unión de los anticuerpos relevantes. Considerando D1 reporta que los mAbs anti CepsilonmX están uniendo el epitope RADWPGPP, que es una parte diferente del péptido, no hay incentivo para llegar a la solución reivindicada.

Las reivindicaciones 18-21, 24-31, 38-42, 48 y 56-58 también involucran un paso inventivo.

Re Punto VIII

CLARIDAD

La designación M1´ para el péptido largo 52 aa correspondiente al dominio de mIgE que está entre la membrana sujetadora del péptido y el dominio CH4 es diferente a la terminología utilizada en el arte previo, la cual es ya sea dominio proximal de membrana extracelular (EMPD) o dominio CepsilonmX. Esta inconsistencia debería ser evitada para cumplir los requerimientos de claridad (Art. 6 PCT).

El uso de designaciones internas 47H4, 7A6, 26A11, 47H4v5, 7A6v1 y 26A11v6 en las reivindicaciones 10, 18-20, 24, 25, 38 y 48 no cumple los requerimientos de claridad del artículo 6 PCT. La designación completa de los hibridomas superaría la objeción.

Es claro de la descripción en las páginas 122, 128-30, 133 que las características de la reivindicación 10 son esenciales en la definición de la invención.

Ya que las reivindicaciones independientes 1, 3, 14, 16, 18, 37, 43, 50, 51, 54-56 y 58 no contienen estas características ellas no cumplen el requerimiento del artículo 6 PCT tomado en combinación con la regla 6.3(b) PCT que cualquier reivindicación independiente debe contener todas las características técnicas esenciales para la definición de la invención.

HOJA MODIFICADA

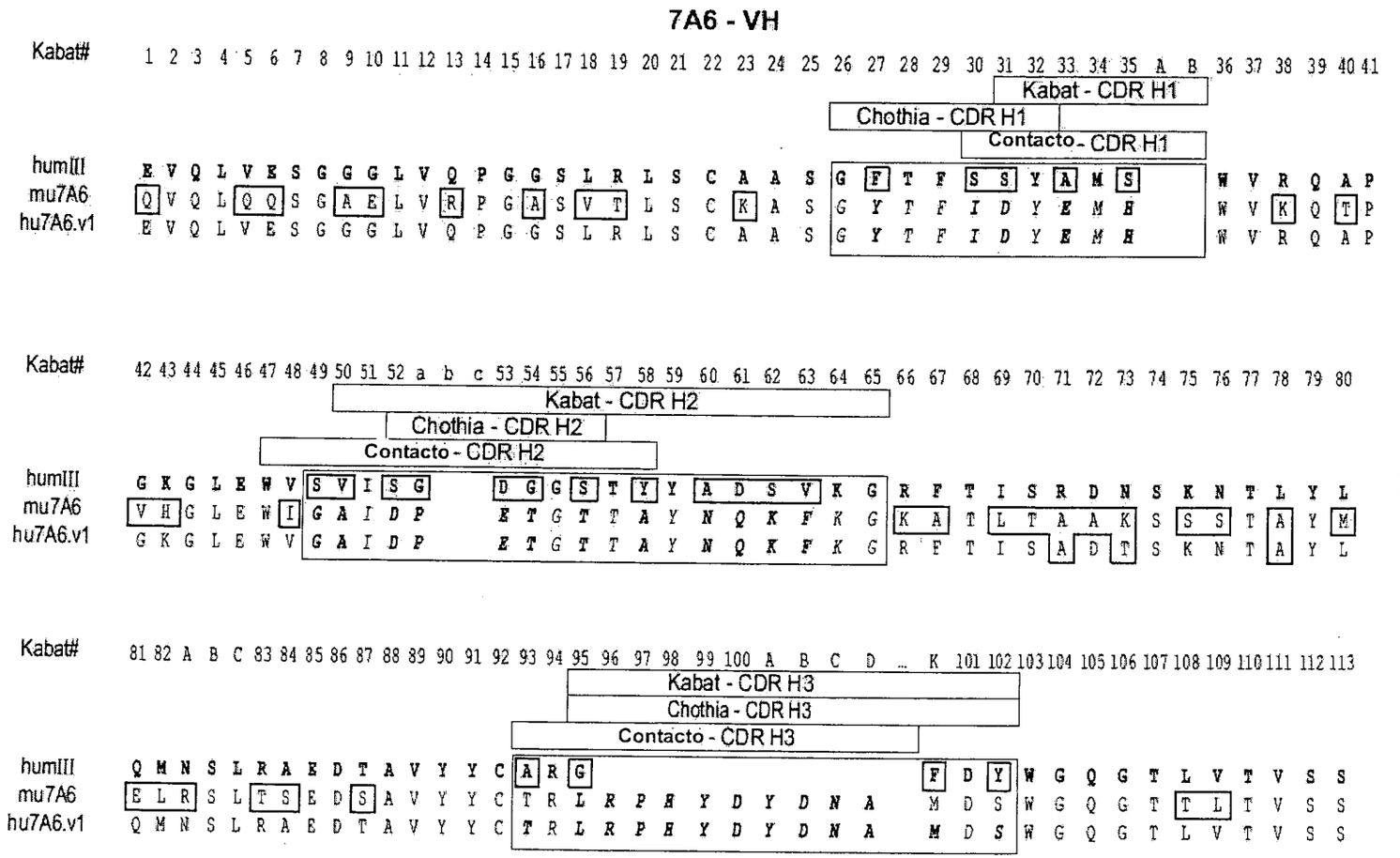


FIG. 6E

HOJA MODIFICADA

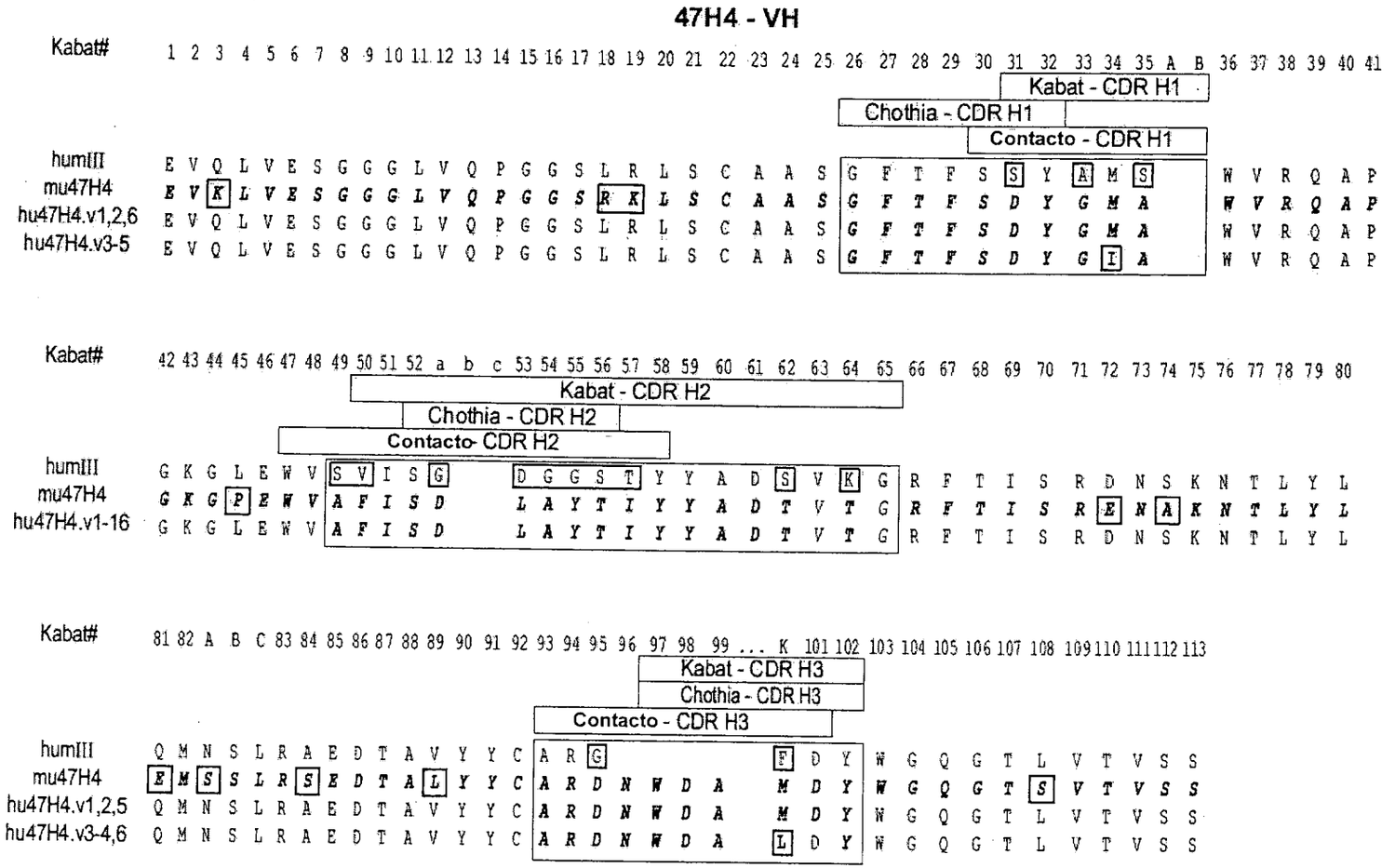


FIG. 6F

Efecto de Anti-IgE/M1' en Respuesta Secundaria /Memoria a TNP-OVA

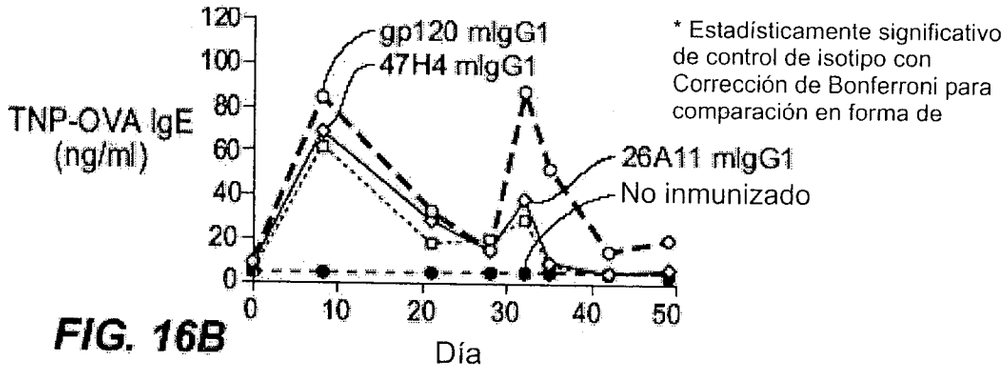
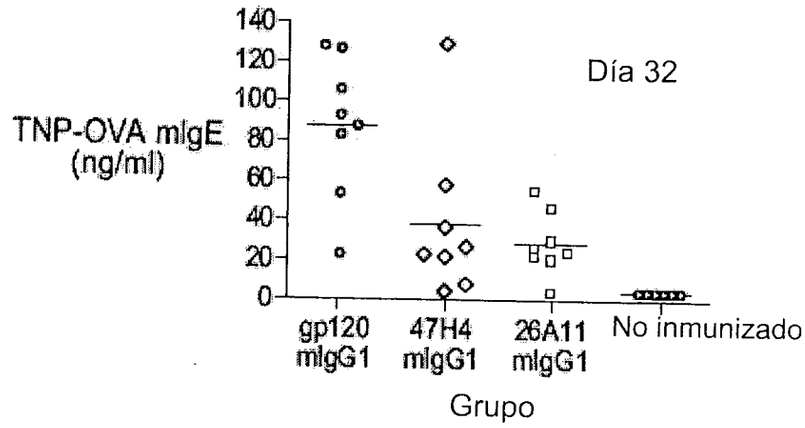


FIG. 16B

Efecto de Anti-IgE/M1' en los Niveles de IgE en Respuesta Inmune de Memoria a TNP-OVA



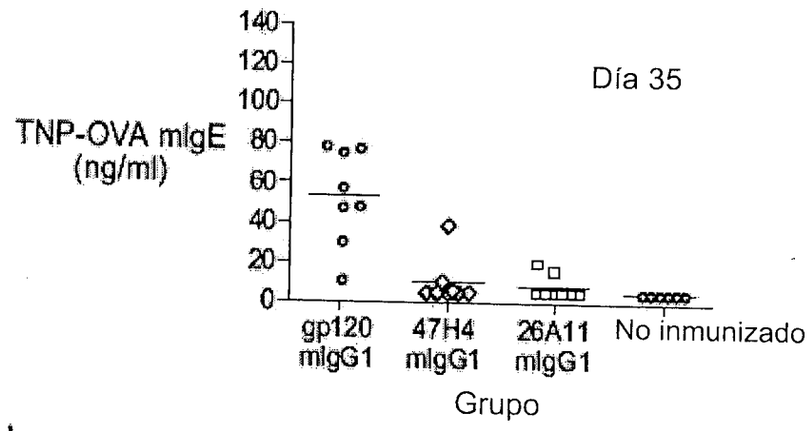


FIG. 16C

HOJA MODIFICADA

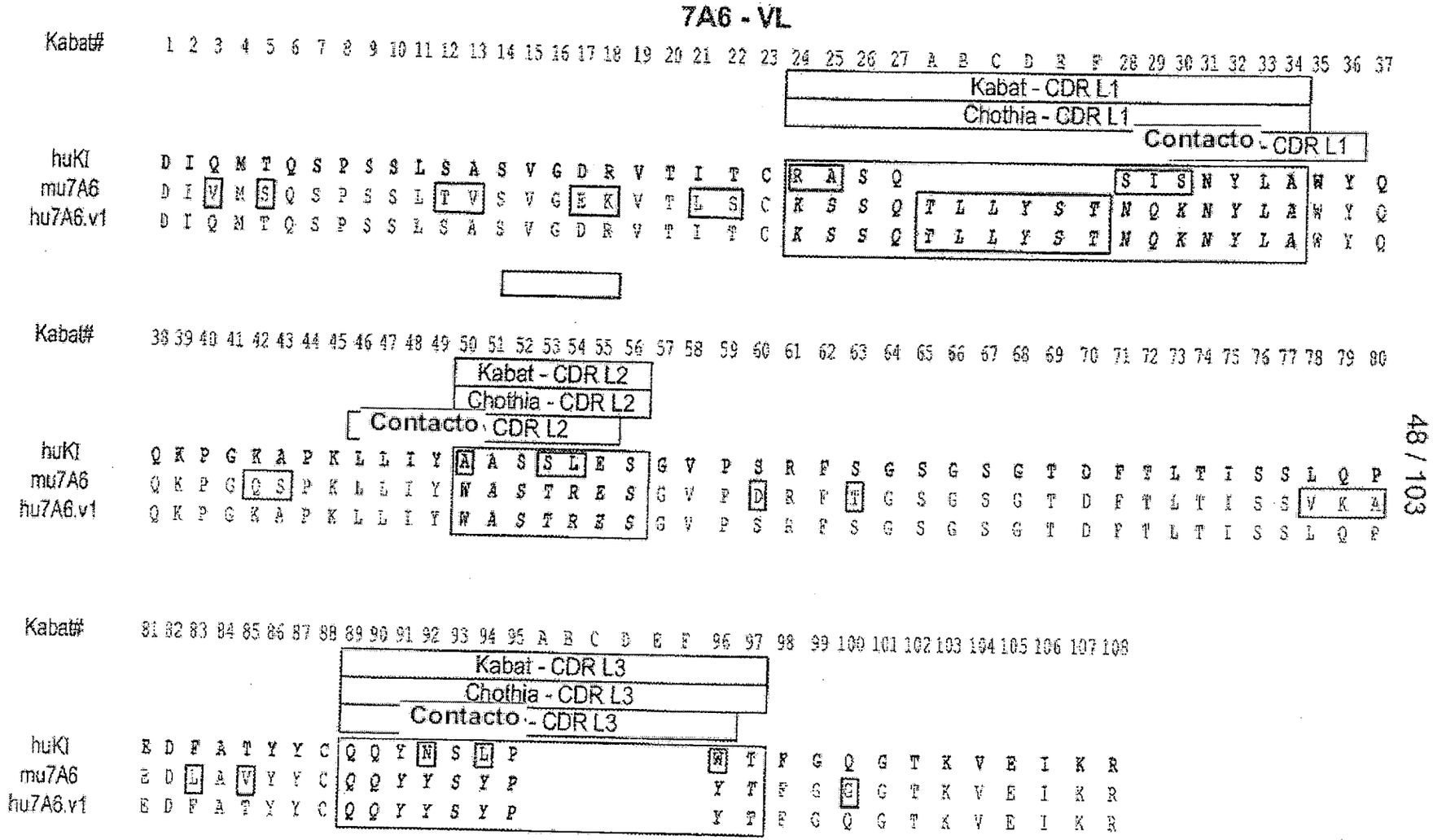


FIG. 6B

34

AB: 99903

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by AIDA MICLAT GUIAM*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of AIDA MICLAT GUIAM, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of December 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 267083*
9. *Seal/Stamp:*

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

10. *Signature*

Secretary of State

BY

NP-24 A (REV. 4-05)

OSP 05 90772

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On December 6, 2005 (Date) before me, Aida Miclat Guiam (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

☐ personally known to me
☒ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person~~(s)~~ whose name~~(s)~~ is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity~~(ies)~~, and that by his/~~her/their~~ signature~~(s)~~ on the instrument the person~~(s)~~, or the entity upon behalf of which the person~~(s)~~ acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Aida Miclat Guiam
Signature of Notary Public

AIDA MICLAT GUIAM
Commission # 1455662
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Dec 9, 2007

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

ante la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 DIC. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Brigard & Castro
BOGOTA - COLOMBIA

317

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **BEATRIZ JARAMILLO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **HECTOR GOMEZ MEJIA**,, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) **Genentech, Inc.**
1 DNA Way

domiciled in **South San Francisco, California 94080-4990 USA**

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or explotation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s) with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **BEATRIZ JARAMILLO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **HECTOR GOMEZ MEJIA**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in **South San Francisco, California USA**

this 5th day of December 2005

Signature

Name Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Title Section Patent Counsel
Authorized Corporate Signatory
Genentech, Inc.

Esta es fiel copia tomada de la Notaría Cuarenta de este Círculo se asemejó la presente fotocopia que consta de una hoja útil, la cual coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

318

AUTHORIZATION

Genentech, Inc. hereby authorizes any of Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec and Timothy R. Schwartz, for so long as they remain employees of Genentech, Inc., to execute, on its behalf, any submissions associated with the filing, prosecution, granting, and extension and maintenance of grant of patent and trademark applications in the U.S. and foreign countries, contracts relating to biological deposits with the American Type Culture Collection, and assignments to publishers of copyrights covering works authored by Genentech employees.

August 27, 2002
Dated

Sean Johnston
Sean A. Johnston
Vice President,Intellectual Property
Genentech, Inc.



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **Genentech, Inc.** domiciliada en **1 DNA Way, South San Francisco, California 94080-4990, Estados Unidos de América**.

ESTADO DE CALIFORNIA
SECRETARIA DE ESTADO

APOSTILLA
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

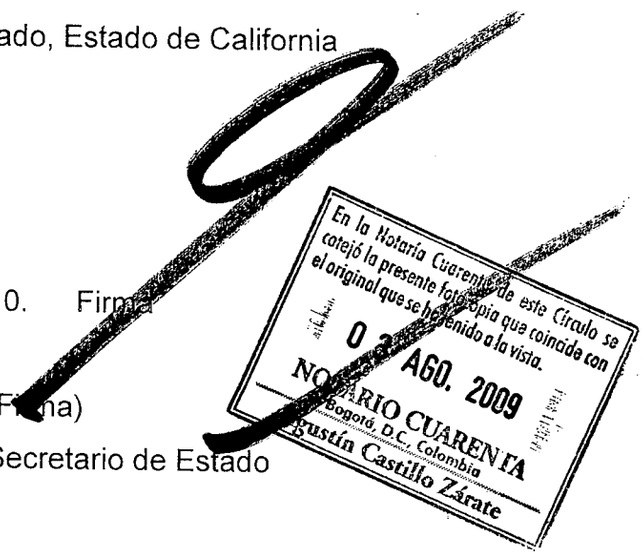
1 País: Estados Unidos de América
Esta documento público
2. ha sido firmado por AIDA MICLAT GUIAM
3. actuando en capacidad de Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello/timbre de AIDA MICLAT GUIAM, Notario Público Estado de California

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el 15 de diciembre de 2005
7. por el Secretario de Estado Delegado, Estado de California
8. No. 267083
9. Sello/Timbre

10. Firma

(Firma)
Secretario de Estado



320

RECONOCIMIENTO TODO-PROPOSITO DE CALIFORNIA

Estado de California)
} ss.
Condado de San Mateo)

El 6 de diciembre de 2005, ante mi, AIDA MICLAT GUIAM, apareció personalmente Thimoty R. Schwartz

☐ a quien conozco personalmente

☒ quien demostró ante mi en base a evidencia satisfactoria ser la persona cuyo nombre esta suscrito en el instrumento y quien reconoció ante mi que ejecutó el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en el instrumento la persona o la entidad a nombre de la cual la persona actuó, ejecutó el instrumento.

Hay un sello que dice:
AIDA MICLAT GUIAM
COMISIÓN # 14556612
Notario Público-California
Condado de San Mateo
Mi comisión expira Dic. 9 de 2007

Atestigua mi firma y sello oficial,

AIDA MICLAT GUIAM

----------**OPCIONAL**----------

Aunque la información en esta sección no es requerida por la ley, puede probar ser valiosa para las personas que se basan en el documento y puede prevenir la remoción y readhesión fraudulenta de esta forma a otro documento

Descripción adicional de cualquier documento anexo

Título o tipo de documento: _____

Fecha del Documento: _____ Número de páginas: _____

Firmante(s) diferente(s) a (los) nombrado(s) arriba: _____

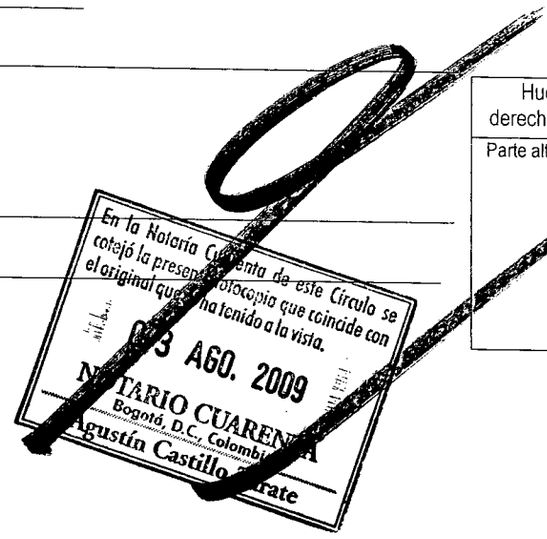
Capacidad(es) Reivindicada(s) por el (los) firmante(s)

Nombre del firmante:_____

☐ Individuo
☐ Funcionario Corporativo – Titulo(s): _____
☐ Socio - ☐ Limitado ☐ General
☐ Abogado de hecho
☐ Fideicomisario
☐ Guardián o conservador
☐ Otro: _____

El firmante representa: _____

Huella índice derecho del firmante
Parte alta del dedo aquí



321

AUTORIZACION

Genentech, Inc. por la presente autoriza a cualquiera de Janet E. Hasak, Mark T. Kresnak, Jeffrey S. Kubinec y Thomity R. Schwartz, mientras permanezcan como empleados de Genentech, Inc., a ejecutar, a su nombre, cualquier solicitud asociada con presentación, procesamiento, consecución, y extensión y mantenimiento de concesión de solicitudes de patente y marca registrada en los Estados Unidos y países extranjeros, contratos relacionados con depósitos biológicos con la Colección Americana de Tipo de Cultivo, y cesiones a publicistas de derechos de autor que cubran los trabajos de autoría de los empleados de Genentech.

27 de Agosto de 2002
Fechado

(Firma)
Sean A. Johnston
Vicepresidente, Propiedad Intelectual
Genentech, Inc.



322

97.300
114

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254030

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta del Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

03 AGO. 2009

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

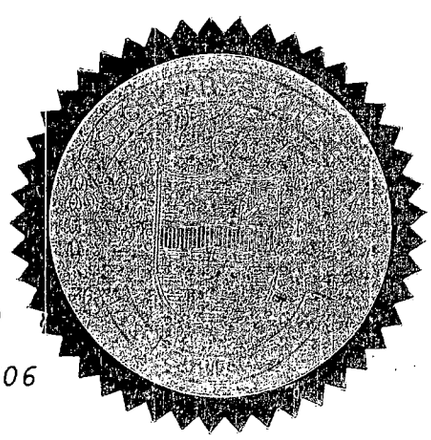
30

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

AUTHENTICATION: 3900384

050426506

DATE: 05-24-05

324

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

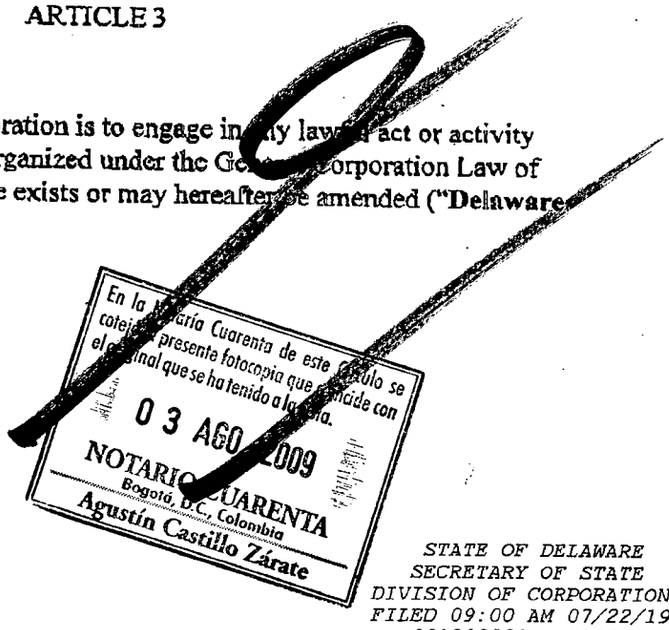
The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").



STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine in the manner provided by law, the particulars of

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que ha tenido a la vista.
3 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series; (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARÍA CUARENTA
Bogotá D.C. Colombia
Agustín Castillo Parate

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

332

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum.* Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions.* Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

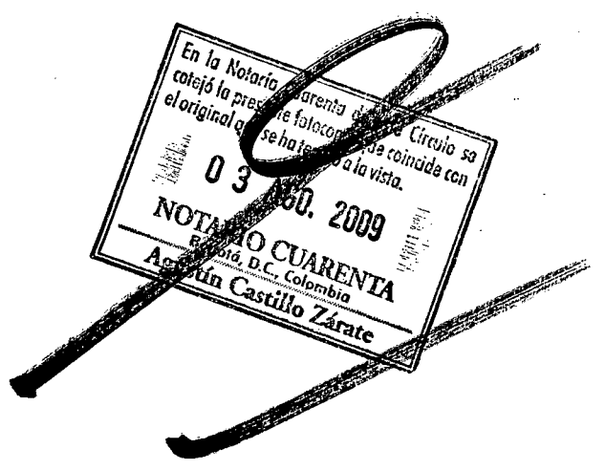
SECTION 9.05. *Contracts Covered.* For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation or any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

Folio
Colegio Notaria Cuarenta de este Círculo se
el presente fotocopia que coincide con
original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

333

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.



IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc.

APOSTILLA

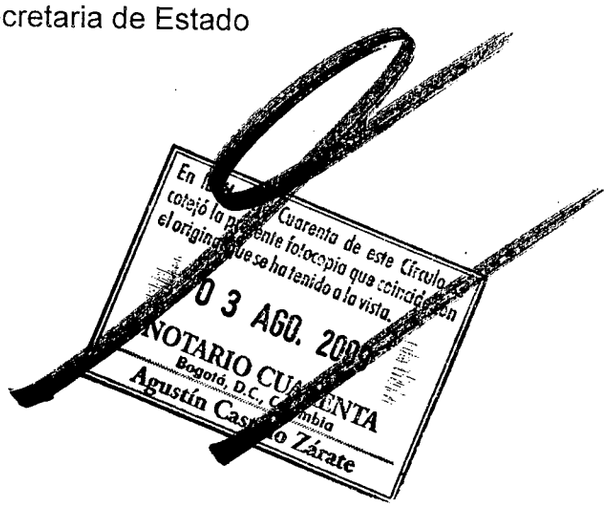
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254030
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



7336

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL VIGÉSIMO SEGUNDO DÍA DE JULIO, A. D. 1999, A LAS 9 EN PUNTO DE LA MAÑANA.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900384

FECHA: 05 – 24 – 05

337

CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
GENENTECH, INC.

Genentech, Inc (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, por la presente corrige el Certificado de Incorporación, el fue presentado originalmente el 23 de diciembre de 1986, bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y corregido subsiguientemente.

Por la presente se vuelve a redactar el certificado de incorporación de la Corporación y se corrige aun más para que diga en su totalidad lo que sigue:

ARTICULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech, Inc.

ARTICULO 2

La dirección de la oficina registrada de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, Ciudad de Wilmington, Condado de New castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

ARTICULO 3

El propósito de a Corporación es el de participar en cualquier acto o actividad legal para las cuales las corporaciones pueden ser organizadas bajo la Ley General de Corporación del Estado de Delaware como existe o puede se modificada la misma en adelante ("**Delaware Law**").

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
3 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. - Colombia
Agustina Castillo Morales

ARTICULO 4

SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de cuatrocientos millones (400,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones

preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trecientos millones (300,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones puede incrementarse o disminuirse (pero no por debajo del número del número de acciones de las mismas que en su momento están vigentes) por el voto afirmativo de una mayoría con poder de votación de las acciones vigentes de la Corporación con derecho a votar por la misma independiente de las consideraciones de la Sección 242(b)(2) de la Ley de Delaware.

SECCION 4.02. *Acción Común.* (a) *Emisión y Consideración.* Cualquier acción sin emitir o del tesoro del las Acciones Comunes puede emitirse para tal consideración como pueda fijarse de acuerdo con la ley aplicable cada cierto tiempo por la Junta Directiva.

(b) *Dividendos.* Sujeto a los derechos de los accionistas de las Acciones Preferenciales, los accionistas de Acciones Comunes deberán tener el derecho a recibir, cuando y como se declare por la Junta Directiva, de los activos de la Corporación los cuales están disponibles para ello por ley, dividendos pagables ya sea en dinero, propiedad, o acciones y los accionistas de la Acción Preferencial no tendrán derecho a participar en tales dividendos (a menos que la Junta Directiva determine lo contrario en cualquier resolución que establezca la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCIÓN 4.03. *Acción Preferencial*

(a) *Series y Límites de Variaciones entre Series.* Cualquier acción no emitida o del tesoro de las Acciones Preferenciales puede emitirse cada cierto tiempo en una o más series para tal consideración como pueda ser fijada cada cierto tiempo por la Junta Directiva. Antes de que se emita cualquier acción de las Acciones Preferenciales de cualquier serie particular, se deberá presentar un certificado ante el Secretario de Estado de Delaware estableciendo las designaciones, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones que irán anexas a las Acciones Preferenciales de tal serie y tales otras cuestiones como puedan requerirse, y la Junta Directiva deberá fijar y determinar, y por la presente está expresamente autorizada para fijar y determinar, en la forma provista por la ley, los

En la Notaría ... copia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
0 ... AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
... Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

particulares de las acciones de tal serie (siempre y cuando no sean inconsistentes con las condiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluyendo, pero sin limitarse a, las siguientes:

(i) la designación distintiva de tal serie y el número de las acciones que han de constituir tal serie, numero que puede incrementarse (excepto cuando lo determine de otro modo la Junta Directiva al crear tal serie) o reducida (pero no por debajo del número de acciones de las mismas que están vigentes) cada cierto tiempo por una acción semejante de la Junta Directiva;

(ii) la tasa anual de dividendos a pagar sobre las acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales se pagarán tales dividendos y le fecha a partir de la cual los dividendos serán acumulativos en el evento que la Junta Directiva determine que los dividendos serán acumulativos;

(iii) si la serie tendrá o no derechos de voto, además de los derechos de voto provistos por la ley, y de ser así, los términos de tales derechos de voto;

(iv) si tal serie tendrá o no privilegios de conversión y, de ser así, los términos y condiciones de tal conversión, incluyendo, pero sin estar limitado a, la condición para ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y de tal forma como la Junta Directiva lo determine;

(v) si las acciones de tal serie serán o no redimibles y, de ser así, los términos y condiciones de tal redención, incluyendo la fecha o fechas en las cuales o después de las cuales pueden ser redimibles, y la cantidad a pagar por acción en caso de redención, cantidad que variará bajo diferentes condiciones y en diferentes fechas de redención;

(vi) si tal serie tendrá o no un fondo de inversión para la redención o compra de acciones de esa serie y, de ser así, los términos y la cantidad de tal fondo de inversión;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de una liquidación, disolución o cierre voluntaria o involuntaria de la Corporación, y

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente copia con el original que fue presentado y devuelto a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

los derechos relativos de prioridad, de haber, de pago de acciones de esa serie; y

(viii) cualquier otro derecho relativo, preferencia y limitación de tal serie.

ARTICULO 5

SECCION 5.01. *Enmiendas a los estatutos por los Directores.* (a) En adición y no limitando los poderes conferidos por estatutos, la Junta Directiva esta expresamente autorizada para hacer, alterar, enmendar, rechazar y rescindir los estatutos de la Corporación, sujetos a las secciones 5.01(b) y 5.01(c) a continuación.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.04, 3.05, 3.14 y 5.06 de los estatutos solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 60% de las acciones con derecho a votar las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden ser alteradas, enmendadas, repelidas, o rescindidas por le voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar las mismas que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar las mismas.

SECCION 5.02. *Enmienda del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación solo puede ser alterada, enmendada, repelida, o rescindida por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a voto sobre la misma que representen a más del 60% de las acciones con derecho a votar la misma. La sección 5.01(c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación solo pueden alterarse, enmendarse, repelerse, o rescindirse por el voto afirmativo de los accionistas de capital con derecho a votar la misma que representen más del 90% de las acciones con derecho a votar la misma.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se compulsó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zapata

ARTICULO 6

SECCION 6.01. *Elección del Directorio por los Accionistas de Acción Preferencial.* Durante cualquier periodo cuando los accionistas de cualquier

acción preferencial cualquiera de una o más series de las mismas, que voten como una clase, tengan derecho a elegir un número específico de directores, por razón a atrasos en los dividendos u otras condiciones que les dan el derecho a hacerlo, entonces y durante el tiempo que continúe el derecho (i) el número de directores autorizado de otro modo será incrementado por tal número de directores especificado, y los accionistas de tales Acciones Preferenciales o tales series de las mismas, que votan como una clase, tendrán derecho a elegir los directores adicionales para lo que se provee, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones Preferenciales o series; (ii) cada uno de tales directores adicionales servirá durante tal termino, y tendrá tales poderes de voto, como se han de otorgar en las provisiones pertinentes a tales Acciones Preferenciales o series; y (iii) siempre que los accionistas de cualquiera de tales Acciones Preferenciales o series de las mismas están desprovistos de tales derechos a elegir un número específico de directores, votando como clase, de acuerdo con las condiciones de tales Acciones preferenciales o series, los términos de oficio de todos los directores elegidos por los accionistas de tales Acciones preferenciales o series, que votan como clase, de acuerdo con las condiciones o elegidos para llenar cualquier vacante resultante de la muerte, renuncia o remoción de directores así elegidos por los accionistas de tales Acciones Preferenciales o series, terminarán en adelante y el número autorizado de directores será reducido en concordancia.

SECCION 6.02. *Votaciones.* Las elecciones de directores en una reunión anual o especial de accionistas necesaria no serán por votos escritos a menos que los estatutos de la Corporación digan lo contrario.

SECCION 6.03. *Eliminación de cierta responsabilidad personal de los directores.* (a) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por daños monetarios por violación del deber fiduciario como director hasta donde lo permita la ley de Delaware.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIA CUARENTA
Agustín Castillo Zárate
D.C. Colombia

(b) Cada persona (y sus herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quien fue o es una parte o esta amenazado de ser parte de, o esta involucrado en cualquier acción, demanda o proceso amenazado, pendiente, o completado, ya sea civil, criminal, administrativo o investigativo, por razón del hecho de que esa persona es o fue un director de la Corporación o es o estaba sirviendo por solicitud de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa, será indemnizado y completamente protegido por la Corporación hasta donde lo

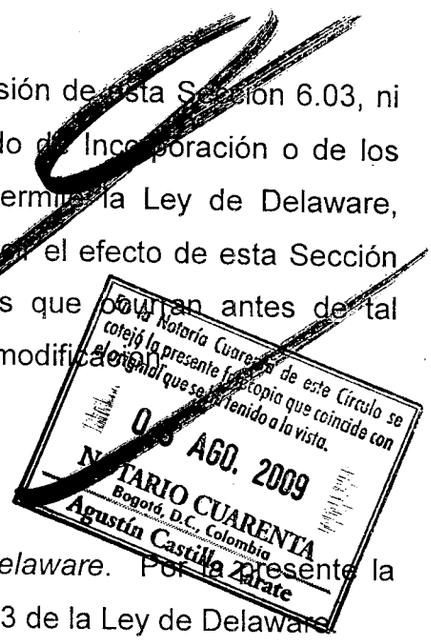
permita la Ley de Delaware. El derecho a la indemnización concedido en esta sección 6.03 también debe incluir el derecho a que la Corporación le pague los gastos incurridos en conexión cuna cualquiera de tales procesos por adelantado de su decisión final hasta donde los autoriza la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferido en esta sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, por acción de su Junta Directiva, proporcionar indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta tal punto y a tal efecto como lo determine apropiado la Junta Directiva y lo autorice la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá el poder de comprar y mantener un seguro a nombre de cualquier persona quien es o fue director, funcionario, empleado o agente de la corporación, o esta o estuvo en servicio por pedido de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente de otra corporación, sociedad, sociedad de riesgo compartido, fideicomiso u otra empresa contra cualquier gasto, responsabilidad o pérdida incurrida por tal persona en cualquier capacidad o que surge de su estado como tal, ya sea si la Corporación tiene o no el poder de indemnizarlo contra tal responsabilidad bajo la ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán exclusivos de ningún otro derecho el cual cualquier otra persona pueda tener o adquirir de aquí en adelante.

(f) Ni la alteración, enmienda, rechazo o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de ninguna condición de este Certificado de Incorporación o de los Estatutos de la Corporación, ni, hasta donde lo permita la Ley de Delaware, ninguna modificación de la ley, debe eliminar o reducir el efecto de esta Sección 6.03 respecto a ninguno de los actos u omisiones que ocurran antes de tal alteración, enmienda, rechazo, rescisión, adopción o modificación.



ARTICULO 7

SECCION 7.01, *Sección 203 de la Ley de Delaware.* Por la presente la Corporación elige no ser gobernada por la Sección 203 de la Ley de Delaware.

ARTICULO 8

SECCION 8.01. *Relación con Roche.* Anticipándose a que la Corporación cese de ser un subsidiaria completamente de propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se define en la sección 8.05) permanezca siendo un accionista de la Corporación, y anticipándose a que la Corporación (como se define en la Sección 8.05) y Roche puede entrar en actividades o líneas de negocios semejantes o similares y tener un interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus relaciones contractuales, corporativas y de negocios con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades concomitantes a cualquier director, quien desea y se propone satisfacer completamente tales deberes fiduciarios del director, al determinar el alcance completo de tales deberes en cualquier situación particular, las condiciones de este artículos 8 se establecen para regular, definir y guiar la conducta de ciertas cuestiones de la Corporación ya que pueden involucrar a Roche y sus funcionaros y directores, y los poderes, derechos, deberes y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con éste.

SECCION 8.02. *Actividades en Negocios Similares.* Excepto que Roche Holdings, Inc. pueda de otra forma acordarlo por escrito,

(a) Roche no tendrá el deber de abstenerse de entrar directamente o indirectamente en actividades de negocios o líneas de negocios semejantes o similares a las de la Corporación, y

(b) ni Roche ni ninguno de sus funcionarios o director de la misma será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar cualquier deber fiduciario por razón de alguna de tales actividades de Roche o de la participación de tal persona en las mismas.

En el evento que Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa tanto para Roche como para la Corporación, Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario como accionista de la Corporación o la persona que controla a un accionista por razón del hacho

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se dio la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
05 AGO. 2009
NOTARIA CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Cantillo Zárate

que Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma, dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad, o no comunica información respecto, u ofrece, tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.03. *Oportunidades Corporativas.* En el evento que un director, funcionario o empleado de la Corporación quien también es director, funcionario o empleado de Roche adquiera conocimiento de una transacción o materia potencial que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (ya se si esta transacción o materia potencial es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación o no), tal director, funcionario o empleado debe tener el derecho a ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o Roche como tal director, funcionario o empleado los considere apropiado bajo las circunstancias de su discreción, y tal director, funcionario o empleado no será responsable a la Corporación o sus accionistas por violar ningún deber fiduciario o deber de lealtad o faltar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de ningún beneficio personal inapropiado por razón del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de a la Corporación) o no comunicó información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche busca o adquiere tal oportunidad corporativa para si misma o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica información respecto a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCION 8.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 8.

SECCION 8.05, *Definiciones.* Para propósitos de este Artículo 8 y el Artículo 9 solamente, (i) el término ***"Corporación"*** debe significar la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido y otras entidades en las cuales la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poder de voto o intereses de voto similares, y (ii) el término ***"Roche"*** debe significar Roche Holdings, Inc y todas las corporaciones, sociedades, sociedades de riesgo compartido, asociaciones y otras entidades (diferentes a la Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta sección 8.05) que son ***"Afiliados"*** (como se

La Notaría Cuarenta del Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

define en la Regla 12b-2 bajo el Acta de Intercambio de Valores de 1934, como se enmendó) de Roche Holdings, Inc.

SECCION 8.06, *Finalización: Efecto Obligante.* Son consideración con nada en este Certificado de Incorporación que lo contradiga, las condiciones anteriores de este Artículo 8 deberán expirar en la fecha que Roche cese de poseer con beneficios Acciones Comunes que representen al menos 5% del número de acciones vigentes de las Acciones Comunes de la Corporación y nadie que se director o funcionario de la Corporación sea también director o funcionario de Roche. Ni tal vencimiento, ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 8 así como tampoco ninguna condición de este Certificado de Incorporación Enmendado y Vuelto a Redactar inconsistente con alguna de las condiciones de este Artículo 8 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 respecto a cualquier materia, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, excepto por este Artículo 8, pueda acaecer o surgir, antes de tal vencimiento, alteración, enmienda o adopción.

SECCION 8.07. *Artículo 9.* Las condiciones de este Artículo son adicionales a las condiciones del Artículo 9.

ARTICULO 9

SECCION 9.01. *Contratos no nulos.* Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización de los mismos) entre la Corporación y Roche será nulo u anulable solamente por razón de que Roche es parte del mismo, o solamente porque cualquiera de los directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados a Roche están presentes en o participan en la reunión de la Junta Directiva o comité de la misma que autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, enmienda, modificación o finalización o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito, pero cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo) estará gobernado por las condiciones de este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y otras leyes aplicables. Para propósitos de este Artículo 9, los términos "***Corporación***" y "***Roche***" tienen los significados establecidos en la Sección 8.05.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

346

SECCION 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que son también directores o funcionarios de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba cualquiera de tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo). Las acciones vigentes de las Acciones Comunes de propiedad de Roche pueden contarse al determinar la presencia de un quórum en una reunión de accionistas que autorice o apruebe tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier enmienda, modificación o finalización del mismo).

SECCION 9.03. *No responsabilidad por acciones de buena fe.* Ni Roche ni ningún funcionario o director de la misma será responsable ante la Corporación o sus accionistas por violar cualquiera de los deberes fiduciarios o deberes de lealtad o por fallar en actuar en (o no oponerse a) los mejores intereses de la Corporación o por derivación de cualquier beneficio personal por razón del hecho que Roche o un funcionario o director de la misma de buena fe tome cualquier acción o ejerza cualquier derecho o de o retenga cualquier consentimiento en conexión con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto dado u otra acción tomada por cualquier persona que es un funcionario, director o representante de Roche, donde el voto o acción es tomado por tal persona en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho o un consentimiento de Roche para los propósitos de cualquiera de tal acuerdo o contrato.

SECCION 9.04. *Consentimiento estimado de los accionistas.* Se considerará que cualquier persona o entidad que compre o de otro modo adquiera algún interés en cualquiera de las acciones de capital de la Corporación ha tenido noticia o ha estado de acuerdo con las condiciones de este Artículo 9.

SECCION 9.05. *Contratos cubiertos.* Para propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o cualquier corporación, sociedad, sociedad de riesgo conjunto, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posee con beneficio (directa o indirectamente) el cincuenta por ciento o más de las acciones con voto, poderes de voto o intereses de voto similares vigentes se considerará un contrato, acuerdo o transacción con la Corporación.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

347

SECCION 9.06. *Efecto obligante*. Ni la alteración, enmienda, cambio o rechazo de alguna de las condiciones de este Artículo 9 ni la adopción de alguna condición inconsistente con cualquier condición de este Artículo 9 eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 respecto a cualquier materia que ocurra, o cualquier causa de acción, demanda o reclamo que, a no ser por este Artículo 9, pueda acaecer o surgir, antes de tal alteración, enmienda, cambio, rechazo o adopción.

SECCION 9.07. *Artículo 8*. Las condiciones de este Artículo 9 son adicionales a las condiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Enmendado y vuelto a Redactar, el cual ha sido adoptado de acuerdo con las secciones 242 y 245 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware y por consentimiento escrito de el único accionista de la Corporación de acuerdo con la sección 228 de Ley General de Corporación del Estado de Delaware, ha sido ejecutado este 22 de Julio de 1999.

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente
Consejo General y Secretaría



348

97.200

2/4

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254031

9. Seal/Stamp:

10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

03 AGO. 2009

NOTARIO CUARENTA

Bogotá, D.C. Colombia

Agustín Castillo Zárate

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900385

DATE: 05-24-05

3D

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 - 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se expide la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

75841

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Incorporación de Genentech, Inc. 350

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254031
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



352

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO VUELTO A REDACTAR DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOQUINTO DIA DE MAYO, A. D. 2000, A LAS 5 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900385

FECHA: 05 – 24 – 05

350

CERTIFICADO DE ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

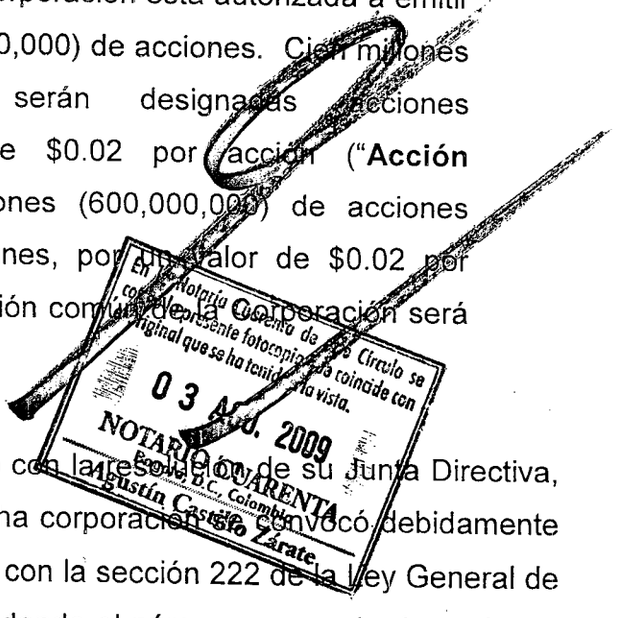
Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de setecientos millones (700,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Seiscientos millones (600,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.



SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

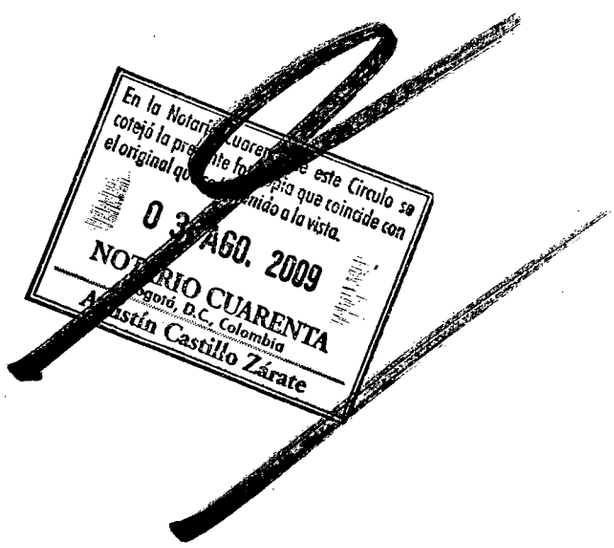
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 15 de Mayo de 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



355

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

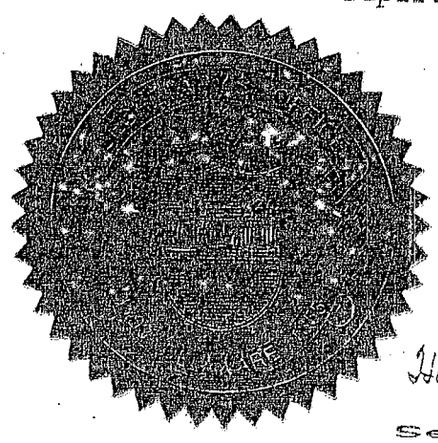
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254033

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

03 AGO. 2009

NOTARIO CUARENTA

Bogotá, D.C., Colombia

Agustín Castillo Zárate

Delaware

356

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900387

DATE: 05-24-05

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

03 AGO. 2009

NOTARIO CUARENTA

Bogotá, D.C., Colombia

Agustín Castillo Zárate

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____

Name: Stephen G. Juelsgaard

Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

#153087

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

358

TRÁDUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

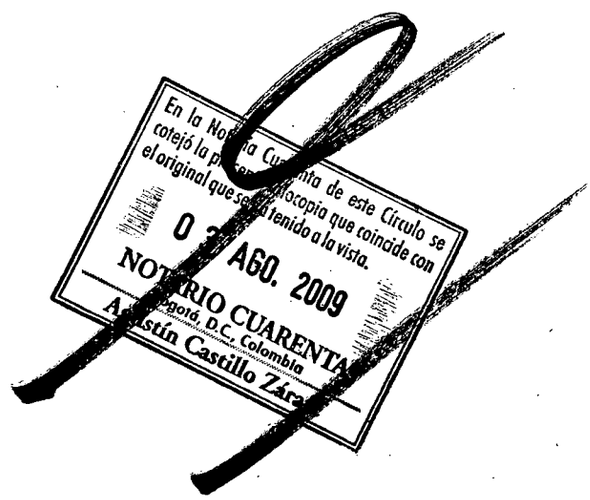
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254033
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado



359

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMOSEXTO DIA DE ABRIL, A. D. 2004, A LAS 7:39 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

360

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de tres mil cien millones (3,100,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Tres mil millones (3,000,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación fue convocó debidamente

En la Notaría Cuarenta del Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

361

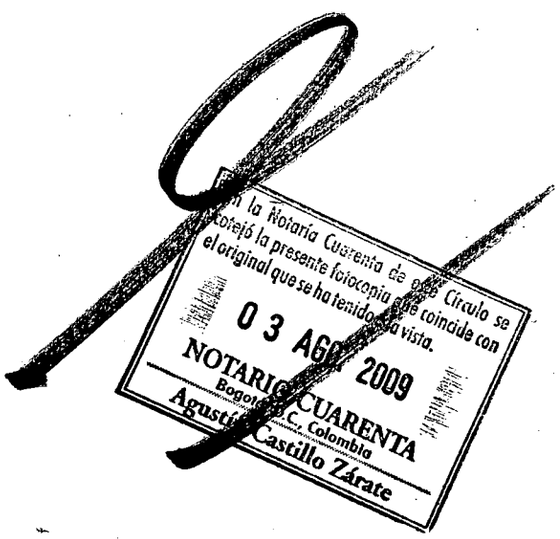
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 16 de Abril de 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



362

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document:

2. has been signed by Harriet Smith Windsor

3. acting in the capacity of Secretary of State of Delaware

4. bears the seal/stamp of Office of Secretary of State

Certified

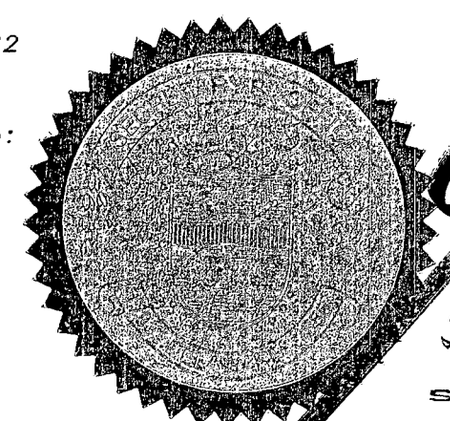
5. at Dover, Delaware

6. the twenty-fourth day of May, A.D. 2005

7. by Secretary of State, Delaware Department of State

8. No. 0254032

9. Seal/Stamp:



10. Signature:

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

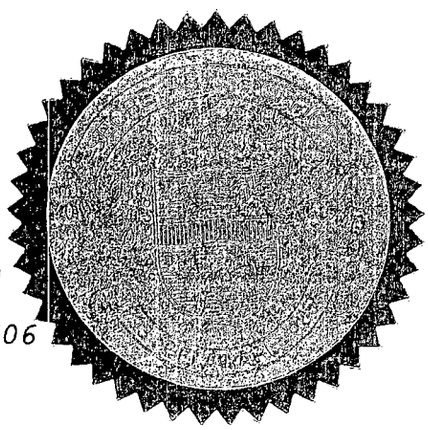


Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.





2112549

050426506

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 3900386

DATE: 05-24-05

364

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/02/00/AM/05/10/2001/ D
P ///010226224/+/2112549////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

86747

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

365

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Certificado de Enmienda de Genentech, Inc.

APOSTILLA

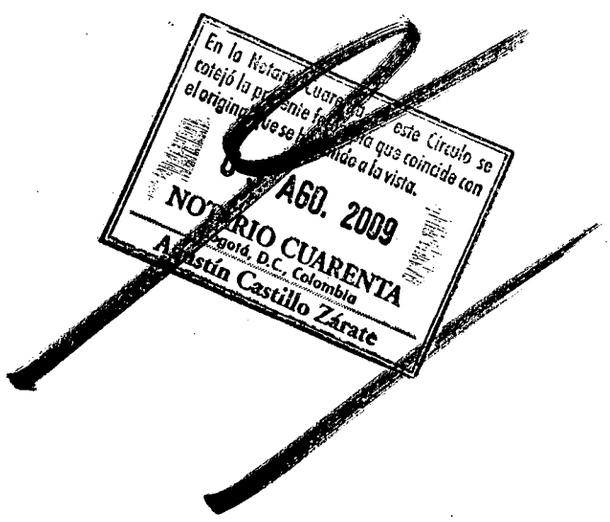
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
   Este documento público
2. ha sido firmado por Harriet Smith Windsor
3. actuando en capacidad de Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello/timbre de la Oficina del Secretario de Estado

Certificado

5. en Dover, Delaware
6. el veinticuatro de mayo, A. D. 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado de Delaware
8. No. 0254032
9. Sello/timbre
10. Firma

Harriet Smith Windsor (Firma)
Secretaria de Estado

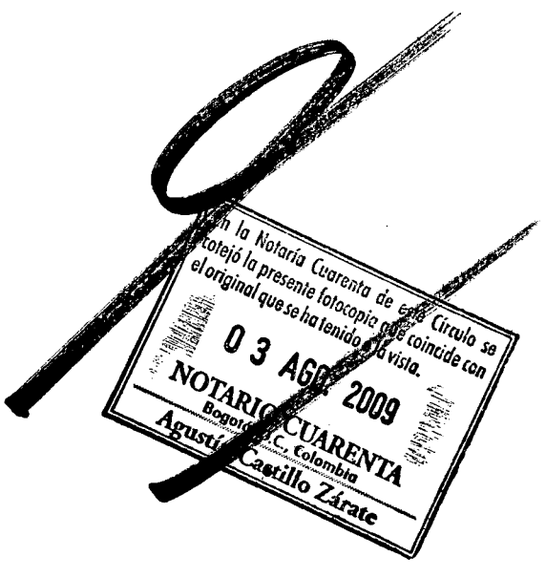


366

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, CERTIFICO POR LA PRESENTE QUE EL ANEXO ES UNA COPIA AUTÉNTICA Y CORRECTA DEL CERTIFICADO DE ENMIENDA DE "GENENTECH, INC", PRESENTADO EN ESTA OFICINA EL DECIMO DIA DE MAYO, A. D. 2001, A LAS 2:05 EN PUNTO DE LA TARDE.



Harriet Smith Windsor (Firma)
Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado
AUTENTICACIÓN: 3900386

FECHA: 05 – 24 – 05

367

CERTIFICADO DE TERCERA ENMIENDA DEL
CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
CORREGIDO Y VUELTO A REDACTAR

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y por virtud de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CERTIFICA POR LA PRESENTE:

PRIMERO: Que en una reunión de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente resoluciones que establecen una enmienda propuesta del certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de dicha corporación, declarando dicha enmienda como aconsejable y llamando a una reunión de accionistas de dicha corporación para consideración de la misma. La resolución establece la enmienda propuesta de la siguiente manera:

RESUELVE, que el Certificado de Incorporación Corregido y vuelto a Redactar de esta corporación se enmiende cambiando "la Sección 4.01(a)" del Artículo allí numerado "4" tal que, como se enmienda, dicha Sección de dicho Artículo se lea de la siguiente manera:

> SECCION 4.01. *Acciones de Capital.* (a) la Corporación está autorizada a emitir dos clases de acciones que deben designarse, respectivamente, acciones preferenciales y acciones comunes. El número total de acciones que la Corporación esta autorizada a emitir es de mil trescientos millones (1,300,000,000) de acciones. Cien millones (100,000,000) de acciones serán designadas acciones preferenciales, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Mil doscientos millones (1,200,000,000) de acciones serán designadas acciones comunes, por un valor de $0.02 por acción ("**Acción Común**"). La acción común de la Corporación será toda de una misma clase.

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se dejó la presente fotocopia que coincide con el original que se le exhibió a la vista.
03 AGO. 2009
NOTARÍA CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

SEGUNDO: Que por lo tanto, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la reunión ordinaria de accionistas de dicha corporación se convocó debidamente y se sostuvo al ser anunciada de acuerdo con la sección 222 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware, en donde el número necesario de acciones requerido por los estatutos votaron a favor de la enmienda.

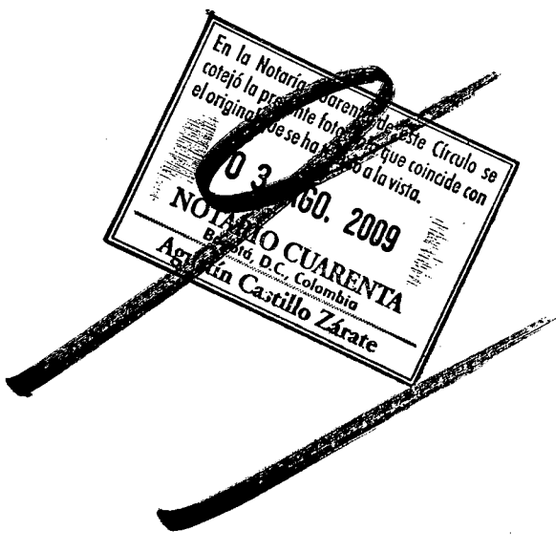
TERCERO: Que dicha enmienda se adoptó debidamente de acuerdo con lo previsto en la Sección 242 de la Ley General de Corporación del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de dicha corporación no será reducido bajo o por razón de dicha enmienda

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicha Genentech, Inc. ha causado este Certificado de Enmienda para que sea firmado por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este 10 de Mayo de 2001.

GENENTECH, INC.

Por: (Firma)
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título: Vicepresidente, Consejo
y Secretaría General.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCIÓN [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [✓]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [✓]
- Descripción de la invención [✓]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [✓]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-118682- -00000-0000
Fecha: 2009-10-22 17:24:54 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 368

arrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
GENENTECH INC

REFERENCIA	Radicación No.	9 118682
	Solicitud internacional	PCT/US2008/057819
	Fecha inicio fase nacional	23/10/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	12151

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 30 OCT. 2009
adpa11