

## ANTICUERPOS CONTRA TRIPTASA, COMPOSICIONES DE ESTOS Y USOS DE ESTOS

### Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

- 5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense N.º 62/457,722, presentada el 10 de febrero de 2017, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

### Listado de secuencias

10

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presentó de forma electrónica en formato ASCII y se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia. Dicha copia de ASCII, creada el 9 de febrero de 2018, se denomina 50474-112WO2\_Sequence\_Listing\_2.9.18\_ST25 y tiene un tamaño de 108.967 bytes.

15

### Campo de la invención

La invención hace referencia a anticuerpos contra triptasa, composiciones farmacéuticas y métodos para utilizarlos.

20

### Antecedentes

25

La triptasa humana beta es una serina proteasa similar a tripsina abundante en mastocitos y, en menor medida, en basófilos. La triptasa humana beta (de la cual hay tres subtipos, triptasa beta 1, triptasa beta 2 y triptasa beta 3) producida por los locus *TPSAB1* y *TPSB2* es la triptasa activa predominante producida por los mastocitos humanos. Estos dos locus producen cuatro isoformas de triptasa; *TPSAB1* produce triptasa alfa y triptasa beta 1, mientras que *TPSB2* produce triptasa beta 2 y triptasa beta 3. La triptasa alfa es mayoritariamente inactiva, así como otras isoformas tales como triptasa gamma, triptasa delta y triptasa épsilon.

30

La triptasa beta activa procesada de forma proteolítica se almacena en los gránulos

secretores de los mastocitos como un tetrámero en complejo con heparina. La desgranulación de los mastocitos, que puede verse provocada por estímulos dependientes de IgE (por ejemplo, alérgenos) o estímulos no dependientes de IgE (por ejemplo, sustancia P o triptasa activa), lleva a la liberación de triptasa beta junto con otras enzimas de gránulos e histamina.

5 Otros estudios anteriores han observado una mayor cantidad de mastocitos en el músculo liso bronquial y epitelio de los pacientes con asma, así como niveles mayores de triptasa beta en el líquido de lavado broncoalveolar. Además, la triptasa contribuye a la hipersensibilidad y broncoconstricción de las vías respiratorias, y también se ha sugerido que desempeña un papel en la fibrosis y regeneración de la matriz extracelular, que son elementos característicos  
10 del proceso de remodelación de las vías respiratorias.

Se ha sugerido que la triptasa se ve implicada en diversas enfermedades y trastornos, que incluyen asma y otros trastornos pulmonares, inflamatorios, autoinmunitarios y fibróticos, para los cuales siguen siendo necesarios mejores agentes terapéuticos, que incluyen antagonistas  
15 terapéuticos contra triptasa y métodos de tratamiento. Se ha intentado desarrollar inhibidores de triptasa de molécula pequeña (ver, por ejemplo, Cairns, J.A., 2005, Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 18:55-66); no obstante, a nuestro entender, no se ha informado ningún agente terapéutico biológico antagonista de triptasa, especialmente anticuerpos antagonistas contra triptasa.

20

### **COMPENDIO DE LA INVENCION**

La presente invención hace referencia a anticuerpos contra triptasa y composiciones farmacéuticas, así como métodos para utilizarlos.

25

En un aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR, por sus siglas en inglés): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que  
30 comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d)

una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo se define mediante seis HVR que comprenden la

5 secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 2, 8, 4, 5 y 6. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además S43, P46 y W47 en la región marco L2 (FR-L2) del dominio variable de cadena ligera (VL) (numeración de Kabat). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al

10 menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes regiones marco

15 (FR) del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); y (d) una FR-H4 que

20 comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos

25 WYQQKPGKSPKWIY (SEQ ID NO: 16); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 18). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la

30 secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En otras modalidades, el anticuerpo

comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

- 5 En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de
- 10 aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una
- 15 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En otras modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

20

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77.

- 25 En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

- 30 En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV

(SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RDNYDWYFDV (SEQ ID NO: 29); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPARFSGSGSGTSYSLTISSEMEAEADAATYYC (SEQ ID NO: 27); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de amino que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; (b) un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) una FR-

H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

- 5 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 27); y (d) una FR-  
10 L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, que comprende (a) un dominio VH que  
15 comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20.

20

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un  
25 epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende His51 y al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID  
30 NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67,

- Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o los doce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar tanto la interfaz pequeña de la triptasa humana beta 1 tetramérica como la interfaz grande de la triptasa humana beta 1 tetramérica.
- En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, el anticuerpo se define mediante seis HVR que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34 y 35. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además Arg71 y Val78 en la FR-H3 del dominio VH (numeración de Kabat). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR

(SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 64), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En otras modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de amino que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51 y 52; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 53, 58 o 59; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos

WGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el dominio VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37.

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En otras modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En otras modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81.

5

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

- 10 En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que
- 15 posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53.

- En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos o los
- 20 tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln100, Leu101 y Leu102 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa
- 25 humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o los catorce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el
- 30 epítipo comprende Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la

SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un tetrámero de la triptasa humana beta 1, y el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o ambos de Gln35 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la interfaz pequeña y/o la interfaz grande de la triptasa humana beta 1.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo se une además a la triptasa de mono cynomolgus (cyno). En algunas modalidades, el anticuerpo se une además a la triptasa humana alfa. En algunas modalidades, el anticuerpo se une además a la triptasa humana beta 2 o triptasa humana beta 3. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa humana beta 2 y triptasa humana beta 3.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 1 nM o menor. En algunas modalidades, la  $K_D$  se mide a través de un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 120 pM a alrededor de 0.5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 120 pM a alrededor de 300 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 120 pM a alrededor de 200 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 180 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 400 pM. En algunas modalidades, el ensayo de SPR se lleva a cabo a 25 °C. En algunas modalidades, la  $K_D$  se mide mediante el uso del ensayo de SPR BIACORE®, por ejemplo, tal como se describe en el apartado (A)(vii) del Ejemplo 1. En algunas modalidades, el ensayo de SPR puede utilizar un dispositivo BIAcore® T200 o un dispositivo equivalente. En algunas modalidades, se inmovilizan chips de detección BIAcore® Series S CM5 (o chips de detección equivalentes) con anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG humana (Fc) y luego se capturan anticuerpos contra triptasa en la celda de flujo. Se inyectan diluciones triples en serie del monómero de triptasa humana beta 1 marcada con His (SEQ ID NO: 128) a una velocidad

de flujo de 30  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Cada muestra se analiza con una asociación de 3 min y una disociación de 10 min. El ensayo se lleva a cabo a 25 °C. Luego de cada inyección, se regenera el chip mediante el uso de  $\text{MgCl}_2$  3 M. La respuesta de unión se corrige al restar las unidades de respuesta (RU, por sus siglas en inglés) de una celda de flujo que capturan una IgG no pertinente a una densidad similar. Se utiliza el modelo Languir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{\text{on}}$  y  $k_{\text{off}}$  para análisis de los parámetros cinéticos.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad enzimática de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe la actividad de la triptasa con una  $\text{IC}_{50}$  de alrededor de 2.5 nM o menor según se determina a través de un ensayo enzimático de triptasa humana beta mediante el uso de un péptido sintético S-2288 como sustrato. En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe la actividad de la triptasa con una  $\text{IC}_{50}$  de alrededor de 550 pM a alrededor de 2.5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe la actividad de la triptasa con una  $\text{IC}_{50}$  de alrededor de 500 pM a alrededor de 2 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe la actividad de la triptasa con una  $\text{IC}_{50}$  de alrededor de 550 nM a 1.5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo inhibe la actividad de la triptasa con una  $\text{IC}_{50}$  de alrededor de 500 pM a alrededor de 700 pM. En algunas modalidades, la actividad de inhibición del anticuerpo se determina tal como se describe en el Ejemplo 1(A)(viii)(a)). En algunas modalidades, la concentración final de heparina en el ensayo enzimático de triptasa humana beta con el péptido sintético S-2288 es 66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . En algunas modalidades, la enzima activa del tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante se diluye a 0.75 nM en amortiguador TNH (Tris 200 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/mL de heparina, TRITON™ X-100 al 0.01 %, pH 8.0) y se combina 1:1 con anticuerpos contra triptasa (diluidos en PBS) en placas de 384 pocillos. Se incuban las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve. El sustrato colorimétrico S-2288 (Chromogenix, parte n.º 82-0852-39) o un sustrato equivalente, se diluye a 1200  $\mu\text{M}$  en amortiguador TNH y se agrega a la placa. En algunas modalidades, las concentraciones finales en los pocillos son de 400  $\mu\text{M}$  de S-2288, 0.25 nM de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante, 66  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de heparina y de 0.10 a 222 nM de anticuerpo contra triptasa. Las placas se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y luego se leen a  $A_{405}$ . La  $\text{IC}_{50}$  de los anticuerpos contra triptasa se determina a partir de un

ajuste de cuatro parámetros de sus curvas respectivas.

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad enzimática de la triptasa humana beta 1 a pH 6. En particular, la actividad de inhibición del anticuerpo puede determinarse a pH 6.

En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la estimulación mediada por triptasa de la proliferación celular del músculo liso bronquial y/o la contracción a base de colágeno. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la liberación de histamina de los mastocitos. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la liberación de histamina desencadenada por IgE y/o la liberación de histamina desencadenada por triptasa. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la triptasa D1 de cyno, según se analiza mediante un ensayo ELISA de triptasa activa. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de triptasa en muestras nasales o lavado broncoalveolar (BAL, por sus siglas en inglés) de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica cuando se encuentra en formato monovalente. En algunas modalidades, el formato monovalente es un formato Fab. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica en presencia de heparina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa beta tetramérica en presencia de 66 µg/ml de heparina.

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos precedentes. En algunas modalidades, si el anticuerpo se une al mismo epítipo o compite por la unión a la triptasa humana beta 1 se determina mediante un ensayo de clasificación de epítopos. En algunas modalidades, el ensayo de clasificación de epítopos es un ensayo de clasificación de epítopos OCTET® tal como se describe en el apartado C del Ejemplo 3. En algunas modalidades, la proteína monomérica de triptasa humana beta 1 se biotinila en el residuo Lys al reaccionar con NHS-PEG4-biotina. El monómero biotinilado se diluye a 5 µg/ml en amortiguador cinético (ForteBio, Inc.) y se inmoviliza en puntas de sensor de estreptavidina (ForteBio, Inc.). Luego de la etapa de

inmovilización, los sensores inmovilizados con triptasa humana beta 1 se saturan con el primer anticuerpo, se diluyen 10-20 µg/ml, seguido por la unión con un segundo anticuerpo diluido a 2.5 µg/ml. En algunas modalidades, el ensayo de clasificación de epítomos se lleva a cabo a 30 °C.

5

En otro aspecto, la invención presenta un anticuerpo que compite por la unión a la triptasa humana beta 1 con cualquier otro de los anticuerpos que anteceden, o los bloquea de forma cruzada, o estos bloquean al anticuerpo.

- 10 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo es monoclonal, humano, humanizado o quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es humanizado.

- 15 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une a triptasa. En algunas modalidades, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fab, Fab'-SH, Fv, scFv y (Fab')<sub>2</sub>.

- 20 En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos que anteceden, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. En algunas modalidades, un anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1. En algunas modalidades, un anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG4. En algunas modalidades, el anticuerpo IgG4 comprende una mutación en la región bisagra. En algunas modalidades, la mutación es una mutación de sustitución. En algunas modalidades, la mutación de sustitución
- 25 está en el residuo de aminoácido S228 (numeración EU). En algunas modalidades, el anticuerpo IgG4 comprende una mutación S228P (numeración EU).

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo es un anticuerpo monoespecífico.

30

En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos precedentes, el anticuerpo es un

anticuerpo multiespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende un primer dominio de unión que se une a triptasa y un segundo dominio de unión que se une a una segunda molécula biológica, donde la segunda molécula biológica se selecciona del grupo que consiste en interleucina-13 (IL-13), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-17 (IL-17), IgE e interleucina-33 (IL-33). En algunas modalidades, la segunda molécula biológica es IL-13. En algunas modalidades, la segunda molécula biológica es IL-33. En algunas modalidades, la segunda molécula biológica es IgE.

- 10 En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente o un conjunto de ácidos nucleicos aislados que codifican en conjunto un anticuerpo.

- 15 En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y/o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, o un conjunto de ácidos nucleicos aislados que en conjunto codifican el anticuerpo, donde el ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 104 y/o la SEQ ID NO: 105.
- 20 En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77, donde el ácido nucleico o conjunto comprende una secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 106 y/o la SEQ ID NO: 107. En algunas
- 25 modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79, donde el ácido nucleico o conjunto comprende una secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 108 y/o la SEQ ID NO: 107. En algunas modalidades, el ácido
- 30 nucleico o conjunto comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 108 y/o la SEQ ID NO: 107.

En otro aspecto, la invención presenta un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo que comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y/o un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, o un conjunto de ácidos nucleicos aislados que en conjunto codifican el anticuerpo, donde el

5 ácido nucleico comprende una secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 109 y/o la SEQ ID NO: 110. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81, donde el ácido nucleico o conjunto

10 comprende una secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 111 y/o la SEQ ID NO: 112. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y/o (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83, donde el ácido nucleico o conjunto comprende una

15 secuencia que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO: 113 y/o la SEQ ID NO: 112. En algunas modalidades, el ácido nucleico o conjunto comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 113 y/o la SEQ ID NO: 112.

En otro aspecto, la invención presenta un vector (por ejemplo, un vector de expresión) o

20 conjunto de vectores que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos aislados o conjunto de ácidos nucleicos aislados descritos en la presente. En otro aspecto, la invención presenta células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos, vectores, conjuntos de ácidos nucleicos y/o conjuntos de vectores antemencionados. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula de mamífero es

25 una célula de ovario de hámster chino (CHO). En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula procariota. En algunas modalidades, la célula procariota es *E. coli*.

En otro aspecto, la invención presenta un método para la producción de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, donde el método comprende cultivar una célula

30 hospedadora que comprende cualquiera de los vectores que anteceden (por ejemplo, vectores de expresión) o conjunto de vectores en un medio de cultivo en condiciones

adecuadas que permiten la producción del anticuerpo. En algunas modalidades, el método comprende además recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora o el medio de cultivo.

5 En otro aspecto, la invención presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende cualquiera de los anticuerpos que anteceden. En algunas modalidades, la composición comprende además un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o a un fragmento de unión al antígeno de esta, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo se une a la triptasa beta 1 monomérica con una  $K_D$  de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 1 nM, y/o donde el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad enzimática de la triptasa con una concentración inhibitoria máxima media (IC50) de alrededor de 0.1 nM a  
15 alrededor de 5 nM, según se determina a través de un ensayo enzimático de triptasa in vitro con S-2288 como sustrato.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 1 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se  
20 une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 0.5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.4 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.2 nM. En algunas modalidades, la  $K_D$  se mide a través de un ensayo de resonancia de plasmones superficiales (SPR). En algunas modalidades, el ensayo de SPR se lleva a cabo a 25 °C. En  
25 algunas modalidades, la  $K_D$  se mide mediante el uso del ensayo de SPR BIAcore®, por ejemplo, tal como se describe en el apartado (A)(vii) del Ejemplo 1. En algunas modalidades, el ensayo de SPR puede utilizar un dispositivo BIAcore® T200 o un dispositivo equivalente. En algunas modalidades, se inmovilizan chips de detección BIAcore® Series S CM5 (o chips de detección equivalentes) con anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG humana (Fc) y  
30 luego se capturan anticuerpos contra triptasa en la celda de flujo. Se inyectan diluciones triples en serie del monómero de triptasa humana beta 1 marcada con His (SEQ ID NO: 128)

a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ l/min. Cada muestra se analiza con una asociación de 3 min y una disociación de 10 min. El ensayo se lleva a cabo a 25 °C. Luego de cada inyección, se regenera el chip mediante el uso de  $MgCl_2$  3 M. La respuesta de unión se corrige al restar las unidades de respuesta (RU) de una celda de flujo que capturan una IgG no pertinente a una densidad similar. Se utiliza el modelo Languir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis de los parámetros cinéticos.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa con una  $IC_{50}$  de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 5 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa con una  $IC_{50}$  de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 2 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa humana con una  $IC_{50}$  de alrededor de 4 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa con una  $IC_{50}$  de alrededor de 0.6 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa a un pH 6 en un ensayo enzimático de triptasa in vitro con S-2288 como sustrato. En algunas modalidades, la actividad de inhibición del anticuerpo se determina tal como se describe en los Ejemplos (por ejemplo, apartado (A)(viii)(a) del Ejemplo 1). En algunas modalidades, la enzima activa del tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante se diluye a 0.75 nM en amortiguador TNH (Tris 200 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/mL de heparina, TRITON™ X-100 al 0.01 %, pH 8.0) y se combina 1:1 con anticuerpos contra triptasa (diluidos en PBS) en placas de 384 pocillos. Se incuban las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve. El sustrato colorimétrico S-2288 (Chromogenix, parte n.º 82-0852-39) o un sustrato equivalente, se diluye a 1200  $\mu$ M en amortiguador TNH y se agrega a la placa. En algunas modalidades, las concentraciones finales en los pocillos son de 400  $\mu$ M de S-2288, 0.25 nM de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante, 66  $\mu$ g/mL de heparina y de 0.10 a 222 nM de anticuerpo contra triptasa. Las placas se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y luego se leen a  $A_{405}$ . La  $IC_{50}$  de los anticuerpos contra triptasa se determina a partir de un ajuste de cuatro parámetros de sus curvas respectivas. En algunas modalidades, la concentración final de heparina en el ensayo enzimático de triptasa humana beta con el péptido sintético S-2288 es 66  $\mu$ g/ml.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo es capaz de inhibir la estimulación mediada por triptasa de la proliferación celular del músculo liso bronquial y/o la contracción a base de colágeno. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la liberación de histamina de los mastocitos. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la liberación de histamina desencadenada por IgE y/o la liberación de histamina desencadenada por triptasa. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de triptasa en muestras nasales o lavado broncoalveolar (BAL) de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica cuando se encuentra en formato monovalente. En algunas modalidades, el formato monovalente es un formato Fab. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa humana beta 1 tetramérica en presencia de heparina. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la triptasa beta tetramérica en presencia de 66 µg/ml de heparina.

En algunas modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además

las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos

5 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el dominio VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKSPKWIY (SEQ ID NO: 16); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). En algunas modalidades, el dominio VL del anticuerpo

15 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y (b) una cadena ligera

20 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende His51 y al menos uno, al

25 menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa

30 humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o

los doce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar tanto la interfaz pequeña de la triptasa humana beta 1 tetramérica como la interfaz grande de la triptasa humana beta 1 tetramérica.

En otras modalidades del aspecto que antecede, el anticuerpo comprende las siguientes seis HVR: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51 y 52; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 53, 58 o 59; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos

WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el dominio VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64),

5 (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la

10 SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de

15 la SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln100, Leu101 y Leu102 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82,

20 Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o los catorce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que

25 consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo comprende Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la

30 triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un tetrámero de la triptasa humana beta 1, y el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o

ambos de Gln35 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la interfaz pequeña y/o la interfaz grande de la triptasa humana beta 1.

5

En otro aspecto, la invención presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro  
10 residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende His51 y al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En  
15 algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos  
20 ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o los doce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID  
25 NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar tanto la interfaz pequeña de la triptasa humana beta 1 tetramérica como la interfaz grande de la triptasa humana beta 1 tetramérica. En algunas modalidades, el anticuerpo  
30 comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que

comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el dominio VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKSPKWIY (SEQ ID NO: 16); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQG TKVEIK (SEQ ID NO: 18). En algunas modalidades, el dominio VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y (b) una cadena ligera

que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79.

En otro aspecto, la invención presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende un anticuerpo monoclonal aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, y un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln100, Leu101 y Leu102 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o los catorce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo comprende Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un tetrámero de la triptasa humana beta 1, y el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o ambos de Gln35 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la interfaz pequeña y/o la interfaz grande de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende las seis HVR que siguen: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de

aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la

5 secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51 y 52; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 53, 58 o 59; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes las FR del

10 dominio VH: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos

15 WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el dominio VH del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende además las siguientes FR del dominio VL: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 64), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID

20 NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio VL del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende (a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y (b) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83.

25

30

En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de unirse además a la triptasa humana alfa,

triptasa beta 2, triptasa beta 3 y/o triptasa cyno D1.

En cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) el anticuerpo puede ser monoclonal, humano, humanizado o quimérico. En algunas modalidades, el anticuerpo es humanizado.

En cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), la composición puede ser para utilizar en un ser humano.

10 Cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) pueden estar liofilizadas. En otras modalidades, cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) pueden ser líquidas.

En cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), el excipiente puede ser un antioxidante. En algunas modalidades, la composición comprende uno o más antioxidantes que se seleccionan del grupo que consiste en N-acetiltriptófano, triptófano, metionina, cisteína, glutatión, tiosorbitol, ácido ascórbico, monotioglicerol, ciclodextrinas, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), piridoxina, manitol y un quelante metálico. En algunas modalidades, la composición comprende N-acetiltriptófano o metionina. En algunas modalidades, la composición comprende N-acetiltriptófano y metionina.

En otro aspecto, la invención presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende: (i) un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana beta 1, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la

secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), donde la oxidación de triptófano en la posición 6 de HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) no es mayor que 30 %. En algunas modalidades, la oxidación de triptófano en la posición 6 de HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) no es mayor que 28 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 % o 6 %. En algunas modalidades, la oxidación de triptófano en la posición 6 de HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) se determina mediante una prueba de estrés de AAPH. En algunas modalidades, la oxidación de triptófano en la posición 6 de HVR-H3 (SEQ ID NO: 8) se determina a menos de un año a partir de la producción inicial de la composición.

Cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede comprender N-acetilriptófano a una concentración de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 5 mM. En algunas modalidades, la concentración de N-acetilriptófano es de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 1 mM. En algunas modalidades, la concentración de N-acetilriptófano es de alrededor de 0.3 mM. En algunas modalidades, la composición comprende metionina a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 20 mM. En algunas modalidades, la concentración de metionina es de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 mM. En algunas modalidades, la concentración de metionina es de alrededor de 5 mM.

En otro aspecto, la invención presenta una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende: (i) un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6); (ii) N-acetilriptófano a una concentración de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 1 mM; y (iii) metionina a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 mM.

En cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones

farmacéuticas) la concentración del anticuerpo puede ser de alrededor de 1 mg/ml a alrededor de 250 mg/ml. En algunas modalidades, la concentración del anticuerpo es de alrededor de 150 mg/ml.

- 5 Cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede incluir además uno o más excipientes adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en un estabilizante, un amortiguador, un tensioactivo y un agente de tonicidad. En algunas modalidades, la composición comprende además un amortiguador. En algunas modalidades, el amortiguador es succinato de arginina y/o succinato de histidina. En algunas
- 10 modalidades, el amortiguador comprende succinato de arginina y succinato de histidina. En algunas modalidades, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 50 mM a alrededor de 500 mM. En algunas modalidades, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 100 mM a alrededor de 300 mM. En algunas modalidades, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 200 mM. En algunas modalidades, la
- 15 concentración de succinato de histidina es de alrededor de 1 mM a alrededor de 50 mM. En algunas modalidades, la concentración de succinato de histidina es de alrededor de 15 mM a alrededor de 25 mM. En algunas modalidades, la concentración de succinato de histidina es de alrededor de 20 mM. En algunas modalidades, la composición comprende además un tensioactivo. En algunas modalidades, el tensioactivo es poloxámero 188 o polisorbato 20. En
- 20 algunas modalidades, el tensioactivo es poloxámero 188. En algunas modalidades, la concentración de poloxámero 188 es de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.1 %. En algunas modalidades, la concentración de poloxámero 188 es de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.05 %. En algunas modalidades, la concentración de poloxámero 188 es de alrededor de 0.02 %. En algunas modalidades, el pH de la composición es de alrededor de 4.5
- 25 a alrededor de 7.0. En algunas modalidades, el pH de la composición es de alrededor de 4.5 a alrededor de 6.5. En algunas modalidades, el pH de la composición es de alrededor de 5.5. En algunas modalidades, la composición se encuentra en un recipiente a prueba de luz. En algunas modalidades, la composición se encuentra en una jeringa precargada.
- 30 Cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede incluir además un antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje

de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRTH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas instancias, el antagonista de IgE es omalizumab (XOLAIR®).

Cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede formularse para administrarse a un ser humano. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos que no comprenden secuencias de región constante no humana. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos que no comprenden secuencias de región constante no humana y de marco no humana. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas comprenden anticuerpos que son anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

En algunos aspectos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden puede utilizarse como medicamento.

En algunos aspectos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden puede utilizarse en el tratamiento de un trastorno. En algunas modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos,

macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD, por sus siglas en inglés) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU, por sus siglas en inglés, también conocida como urticaria espontánea, CSU, por sus siglas en inglés), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática (IPF, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, el anticuerpo es para utilizarlo junto con un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRTH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas modalidades, el anticuerpo es para administrarlo por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica,

intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En determinadas modalidades, el anticuerpo es para administrarlo por vía subcutánea. En algunas modalidades, el anticuerpo es para utilizarlo en un sujeto humano.

- 5 En algunos aspectos, cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede utilizarse como medicamento.

- En algunos aspectos, cualquiera de las composiciones que anteceden (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede utilizarse para el tratamiento de un trastorno. En algunas  
10 modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales  
15 como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o  
20 asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU o CSU), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis  
25 pulmonar idiopática (IPF). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, la composición (por ejemplo, composición  
30 farmacéutica) es para utilizarla junto con un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de IL-13, un

antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CTRH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina

5 cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de

10 unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas modalidades, la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) para administrarla por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En

15 determinadas modalidades, la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) es para administrarla por vía subcutánea. En algunas modalidades, la composición (por ejemplo, composición farmacéutica) es para utilizarla en un sujeto humano.

En algunos aspectos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden puede utilizarse en la

20 fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno. En algunas modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o

25 normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el

30 trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del

grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU o CSU), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, el medicamento se formula para utilizarlo junto con un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CTRH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas modalidades, el medicamento se formula para administrarlo por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En determinadas modalidades, el medicamento se formula para administrarlo por vía subcutánea. En algunas modalidades, el medicamento se formula para utilizarlo en un sujeto humano.

En algunos aspectos, cualquiera de las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) puede utilizarse en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno. En algunas modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un

trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU o CSU), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, el medicamento se formula para utilizarlo junto con un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRTH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra

IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas modalidades, el medicamento se formula para administrarlo por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En determinadas modalidades, el medicamento se formula para administrarlo por vía subcutánea. En algunas modalidades, el medicamento se formula para utilizarlo en un sujeto humano.

En otro aspecto, la invención presenta un método para el tratamiento en un sujeto que lo necesite, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos que anteceden. En algunas modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU o CSU), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, el método comprende además administrarle al sujeto un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un

antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRTH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas modalidades, el antagonista de IgE es omalizumab (Xolair®). En algunas modalidades, el anticuerpo se administra por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En otro aspecto, la invención presenta un método para el tratamiento en un sujeto que lo necesite, donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que anteceden. En algunas modalidades, el trastorno se selecciona del grupo que consiste en un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se selecciona del grupo que consiste en asma, hipersensibilidad de las vías respiratorias y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma con Th2 elevado o asma con Th2 bajo. En algunas modalidades, el trastorno

autoinmunitario se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, el trastorno inflamatorio es urticaria crónica idiopática (CIU o CSU), anafilaxis, choque anafiláctico, dermatitis atópica o rinitis alérgica. En algunas modalidades, el

5 trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es mastocitosis. En algunas modalidades, el método comprende

10 además administrarle al sujeto un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional es un antagonista de unión al eje de IL-13, un antagonista de unión al eje de IL-5, un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRT2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un

15 inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es librikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, el

20 antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas modalidades, el antagonista principal de M1 es omalizumab (Xolair®). En algunas modalidades, la composición se administra por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, tópica, oral, transdérmica, intraperitoneal, intraorbital, por implante, por

25 inhalación, por vía intratecal, intraventricular o intranasal. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

### **Breve descripción de las figuras**

30 **La Figura 1** es una alineación de secuencia de los dominios VH y VL de hu31A.v11 y huE104.v2 que muestra las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de

acuerdo con las denominaciones de Kabat, Chothia y Contact. Las regiones hipervariables (HVR) están subrayadas.

**La Figura 2A** es una serie de gráficas que muestran los resultados de un análisis de inhibición de hu31A.v11 y huE104.v2 IgG según se determina mediante un ensayo enzimático de triptasa humana. Ambos anticuerpos inhibieron por completo la actividad enzimática de la triptasa.

**Las Figuras 2B y 2C** son gráficas que muestran los resultados de los ensayos de proliferación (Figura 2B) y contracción (Figura 2C) de las células del músculo liso (SMC) de las vías respiratorias primarias humanas. La adición de triptasa beta estimuló la proliferación de SMC de las vías respiratorias primarias humanas, que se inhibió de forma dependiente de la dosis mediante la adición del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 IgG4 o huE104.v2 IgG4 (Figura 2B). La adición de triptasa también estimuló la contracción de las SMC de las vías respiratorias primarias humanas, que también se inhibió mediante la adición de hu31A.v11 IgG4 y huE104.v2 IgG4 (Figura 2C).

**Las Figuras 2D y 2E** son gráficas que muestran los resultados de ensayos de desgranulación de mastocitos en los que se estimularon mastocitos in vitro mediante la adición de triptasa beta o IgE contra 4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo (NP) y NP. La adición de triptasa produjo la liberación de histamina, que se bloqueó mediante la adición de hu31A.v11 (Figura 2D). Una triptasa mutante catalíticamente inactiva (S195A) funcionó como control. La adición de IgE y NP también produjo la liberación de histamina, que se inhibió (30-50 %) mediante la adición de un inhibidor de molécula pequeña (SMI) de triptasa o hu31A.v11 (Figura 2E).

**La Figura 3A** es una gráfica que muestra los resultados de la disociación del tetrámero de triptasa humana beta 1 mediante Fab hu31A.v11 analizado con cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Se analizaron con SEC tres ejecuciones: la ejecución 1 contenía solo triptasa tetramérica WT, que produjo el pico 1 con un tiempo de retención  $T_r = 26$  min, un volumen de retención  $V_r = 13$  ml; la ejecución 2 contenía triptasa tetramérica WT + Fab hu31A.v11 + heparina, que produjo el pico 2 ( $T_r = 27.6$  min,  $V_r = 13.8$  ml) y el pico 4 ( $T_r = 31$

min, Vr = 15.5 ml); la ejecución 3 contenía triptasa tetramérica WT + Fab hu31A.v11 sin heparina, que produjo el pico 3 (Tr = 28.1 min, Vr = 14 ml) y el pico 4 (Tr = 31 min, Vr = 15.5 ml).

- 5 **La Figura 3B** es una gráfica que muestra los resultados de la disociación del tetrámero de triptasa humana beta 1 mediante Fab huE104.v2. Se analizaron con SEC tres ejecuciones: la ejecución 1 contenía triptasa monomérica marcada con His + Fab huE104.v2, que produjo el pico 2 (Tr = 25.8 min) y el pico 6 (31.6 min); la ejecución 2 contenía triptasa tetramérica WT + Fab huE104.v2, que produjo el pico 3 (Tr = 26 min) y el pico 7 (Tr = 31.8 min); y la ejecución 3  
10 contenía triptasa tetramérica WT + Fab huE104.v2 + heparina, que produjo el pico 1 (Tr= 21 min), el pico 4 (Tr = 27.2 min) y el pico 5 (Tr= 31.2 min).

**Las Figuras 4A y 4B** son series de gráficas que muestran los resultados de una simulación farmacocinética (PK) que compara la actividad PK y neutralizadora de un anticuerpo contra  
15 triptasa disociante con un anticuerpo estabilizante específico para el tetrámero de triptasa a un nivel inicial de triptasa (4 ng/ml en suero, 10 ng/ml en tejido pulmonar, Figura 4A) o a un nivel elevado de triptasa (10 ng/ml en suero, 40 ng/ml en tejido pulmonar, Figura 4B).

**La Figura 4C** es una serie de gráficas que muestran los resultados de la simulación de  
20 actividad de neutralización que compara un anticuerpo contra triptasa disociante y un anticuerpo estabilizante específico para el tetrámero de triptasa al nivel inicial de triptasa o a un nivel elevado de triptasa.

**Las Figuras 5A y 5B** muestran imágenes de geles en electroforesis en gel de poliacrilamida  
25 con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) con tinción de azul de Coomassie (paneles superiores), que muestran que la triptasa humana beta 1 escindió el fibrinógeno en fragmentos peptídicos tanto a pH 6 (Figura 5A) como 7.5 (Figura 5B). El anticuerpo contra triptasa Fab hu31A.v11 bloqueó la escisión de fibrinógeno tanto a pH 6 como pH 7.5, mientras que el Fab huE102.v2 no lo hizo, en las condiciones experimentales de concentración elevada  
30 de heparina. El carril 1, fibrinógeno solo, muestra las cadenas alfa, beta y gamma de fibrinógeno no escindido; el carril 2, fibrinógeno y triptasa beta; el carril 3, fibrinógeno, triptasa

beta y Fab hu31A.v11; el carril 4, fibrinógeno, triptasa beta e IgG de B12; el carril 5, fibrinógeno, triptasa beta 1 y Fab huE104.v2; y el carril 6 muestra solo mIgG1 de B12. La disminución de la intensidad de la cadena alfa indica actividad proteolítica de la triptasa, que se analizó y se cuantificó en los paneles inferiores.

5

**La Figura 6A** es una gráfica que muestra los resultados de la disociación del tetrámero mutante o WT mediante Fab hu31A.v11. Se analizaron con SEC cuatro ejecuciones: la ejecución 1 contenía tetrámero WT + Fab huE104.v1, que produjo el pico de referencia (Tr = 21.6 min); la ejecución 2 contenía la variante Y75C del tetrámero + Fab hu31A.v11, que produjo el pico 1 (Tr = 25.6 min) y el pico 4 (Tr = 31.6 min); la ejecución 3 contenía la variante I99C del tetrámero + Fab hu31A.v11, que produjo el pico 2 (Tr = 23.9 min) y el pico 4 (Tr = 31.6 min); y la ejecución 4 contenía tetrámero WT + Fab hu31A.v11, que produjo el pico 3 (Tr = 28.1 min) y el pico 4 (Tr = 31.6 min).

10

**La Figura 6B** muestra los resultados de un análisis en gel SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie de picos de cromatografía de exclusión por tamaño de los complejos formados con Fab hu31A.v11 de la Figura 6A con los mutantes de triptasa Y75C e I99C y disociación del tetrámero en dímeros enlazados de forma covalente.

15

**La Figura 6C** es una gráfica que muestra los resultados de la disociación del tetrámero mutante o WT mediante Fab huE104.v2. Se analizaron con SEC tres ejecuciones: la ejecución 1 contenía la variante Y75C del tetrámero + Fab huE104.v2, que produjo el pico 1 (Tr = 21.6 min) y el pico 4 (Tr = 31 min); la ejecución 2 contenía la variante I99C del tetrámero + Fab huE104.v2, que produjo el pico 2 y el pico 5 (Tr = 31 min); y la ejecución 3 contenía tetrámero WT + Fab huE104.v2, que produjo el pico 3 (Tr = 26 min) y el pico 6 (Tr = 31.8 min). Los resultados muestran que el Fab huE104.v2 formó complejos con los mutantes Y75C e I99C de triptasa y solo disoció el tetrámero bloqueado de interfaz grande I99C en dímeros enlazados de forma covalente. Los picos 4, 5 y 6 contienen Fab en exceso, tal como se determinó mediante SDS-PAGE (no se muestran los datos).

25

30

**La Figura 7** muestra la secuencia de aminoácidos de triptasa humana beta 1 madura junto

con la numeración secuencial del gen y el sistema de numeración de quimotripsinógeno (“chymo-numb”) utilizado típicamente para la tripsina serina de mamífero.

**La Figura 8** muestra el epítipo de unión de Fab hu31A.v11 en triptasa humana beta 1 (los  
5 residuos de triptasa poseen todos numeración de quimotripsinógeno).

**La Figura 9** es una representación que muestra el modelado de Fab hu31A.v11 en el  
tetrámero de triptasa. Los monómeros de triptasa en complejo con Fab hu31A.v11 se  
alinearon a los protómeros A y C en el tetrámero de triptasa. Se indican las cadenas pesadas  
10 y las cadenas ligeras. Se resaltan mediante un óvalo punteado las discrepancias entre las  
cadenas ligeras de Fab hu31A.v11 en protómeros de triptasa adyacentes en este modelo.

**La Figura 10** muestra los cambios de la conformación del bucle de 60s de triptasa detectados  
en la estructura compleja. Val60c y Val90 (que se muestran en barras) crean una cavidad  
15 hidrofóbica para la unión de Tyr173d desde el protómero cercano como parte de la interacción  
entre proteínas en la interfaz grande de la triptasa tetramérica. Se indican los protómeros de  
triptasa en la conformación de tetrámero. La triptasa unida a Fab hu31A.v11 se superpone  
con un protómero del complejo de tetrámero. La conformación de Val60c cambia cuando Fab  
hu31A.v11 está unido, lo que crea un impedimento estérico que se espera que evite la unión  
20 de Tyr173d a dicha cavidad (los residuos de triptasa se indican con numeración de  
quimotripsinógeno).

**La Figura 11** muestra los cambios de la conformación del bucle de 30s de triptasa ubicados  
en la interfaz pequeña detectados en la estructura compleja luego de la unión a hu31A.v11.

**La Figura 12A** es una representación de la estructura cristalina del tetrámero de triptasa WT  
en complejo con cuatro Fab huE104.v1. Los protómeros de triptasa se indican de acuerdo con  
la designación de letras de los protómeros (ver Pereira et ál. *Nature* 392:306-311, 1998).

**La Figura 12B** es una representación del efecto de la unión de huE104.v1 en la interfaz  
pequeña del tetrámero de triptasa según se evalúa mediante intercambio de hidrógeno-

deuterio (HDX).

5 **La Figura 13** es una gráfica que muestra los resultados de un análisis farmacocinético (PK) de los anticuerpos contra triptasa humanizados huE104.v2 y hu31A.v11, cada uno administrado mediante inyección intravenosa (IV) a 1 o 10 mg/kg a ratones C57BL/6. La gráfica muestra la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) del anticuerpo contra triptasa en función del tiempo (días). Los resultados son de tres animales.

10 **La Figura 14** es una gráfica que muestra los resultados de un análisis PK de los anticuerpos contra triptasa humanizados huE104.v2 y hu31A.v11, en comparación con un anticuerpo IgG4 contra gD de control. Cada anticuerpo se administró mediante inyección IV a 30 mg/kg a monos cynomolgus (cyno). La gráfica muestra la concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) del anticuerpo contra triptasa en función del tiempo (días).

15 **La Figura 15** es un diagrama esquemático de ensayos para medir la cantidad de triptasa activa (panel izquierdo) y triptasa total (panel derecho) en una muestra. Se indican los monómeros y tetrámeros de triptasa. En el panel izquierdo, se agrega inhibidor de tripsina de soja (SBTI, por sus siglas en inglés). Luego, se agregó un ejemplo de sonda a base de actividad biotinilada (ABP, por sus siglas en inglés) a una muestra que contenía triptasa (por  
20 ejemplo, líquido de lavado broncoalveolar (BAL)) para marcar la triptasa activa. Se detuvo el marcado mediante la adición de un ejemplo de inhibidor de molécula pequeña G02849855 (por ejemplo, BMS-262084, Sutton et ál. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:3229-33, 2002, Qian et ál., *J. Org. Chem.* 2002, 67:3595-3600). Se agregó el anticuerpo hu31A.v11 para disociar los tetrámeros de triptasa. La triptasa marcada se detectó luego en un análisis de  
25 inmunoabsorción enzimática (ELISA) mediante el uso de peroxidasa del rábano picante conjugada a estreptavidina. En el ensayo de triptasa total, se agregó hu31A.v11 a una muestra para disociar los tetrámeros de triptasa de la muestra. Luego se determinó la cantidad de triptasa mediante el uso de ELISA.

30 **La Figura 16** muestra los resultados de un ensayo de triptasa activa llevado a cabo en muestras de BAL obtenidas de monos cyno a los que se administró el anticuerpo contra

triptasa hu31A.v11 por vía intravenosa (IV) a 30 mg/kg. El panel superior muestra un diagrama esquemático del protocolo experimental.

**La Figura 17** es un diagrama esquemático que muestra el protocolo experimental del modelo de exposición cyno *Ascaris* descrito en el Ejemplo 6.

**Las Figuras 18A y 18B** son gráficas que muestran los resultados de un ensayo de triptasa activa (Figura 18A) y un ensayo de triptasa total (Figura 18B) llevados a cabo en BAL obtenido de animales individuales en el experimento de exposición cyno *Ascaris* descrito en el Ejemplo 6.

**La Figura 18C** es una gráfica que muestra los resultados de un ensayo de triptasa total para determinar la cantidad de triptasa total en líquido de la membrana mucosa (MLF, por sus siglas en inglés) nasal obtenido mediante absorción nasal con una matriz de absorción sintética (SAM, por sus siglas en inglés) de animales individuales en el experimento de exposición cyno *Ascaris* descrito en el Ejemplo 6.

**La Figura 19** es una gráfica que muestra que la administración del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 inhibió la anafilaxis sistémica pasiva mediada por IgE en ratones con injertos humanos. Luego de la exposición a IgE, los ratones tratados con el anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 mostraron un mejor mantenimiento de la temperatura corporal en comparación con los ratones tratados con un anticuerpo contra gD de control. \*\*\*  $P < 0.0001$  (prueba T apareada).

## Descripción detallada de las modalidades de la invención

### I. Definiciones

Tal como se usa en la presente, la expresión “alrededor de” hace referencia al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a “alrededor de” un valor o parámetro en la presente incluye (y describe)

modalidades que están dirigidas a ese valor o parámetro en sí.

Un “marco humano aceptor” a efectos de la presente es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena ligera (VL) o de un marco de dominio variable de cadena pesada (VH) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o de un marco de consenso humano, tal como se define a continuación. Un marco humano aceptor “derivado de” un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este, o puede contener cambios en secuencias de aminoácidos. En algunas modalidades, la cantidad de cambios 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. En algunas modalidades, el marco humano aceptor VL tiene una secuencia idéntica a la secuencia de marco de inmunoglobulina humana VL o secuencia de marco de consenso humano.

“Afinidad” hace referencia a 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 compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, tal como se usa en la presente, “afinidad de unión” hace referencia a afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre los miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X con respecto a su compañera Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación ( $K_D$ ). La afinidad puede medirse a través de métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los que se describen en la presente. A continuación se describen modalidades específicas ilustrativas y de ejemplo para medir la afinidad de unión.

25

Al utilizarse en el contexto de las reivindicaciones, la expresión “la  $K_D$  se mide a través de un ensayo de resonancia de plasmones superficiales” significa que la  $K_D$  se mide de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1(A)(vii), que mide los parámetros cinéticos para la unión de los anticuerpos contra triptasa al monómero de triptasa humana beta 1, por ejemplo, el monómero de triptasa marcado con His6 que se muestra en la SEQ ID NO: 128, que no forma espontáneamente un tetrámero de triptasa. El ensayo puede utilizar un dispositivo BIAcore®

30

T200 o un dispositivo equivalente. En resumen, se inmovilizan chips de detección BIAcore® Series S CM5 (o chips de detección equivalentes) con anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG humana (Fc) y luego se capturan anticuerpos contra triptasa en la celda de flujo. Se inyectan diluciones triples en serie del monómero de triptasa humana beta 1 a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Cada muestra se analiza con una asociación de 3 min y una disociación de 10 min. El ensayo se lleva a cabo a 25 °C. Luego de cada inyección, se regenera el chip mediante el uso de MgCl<sub>2</sub> 3 M. La respuesta de unión se corrige al restar las unidades de respuesta (RU) de una celda de flujo que capturan una IgG no pertinente a una densidad similar. Se utiliza el modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis de los parámetros cinéticos.

Un anticuerpo “madurado por afinidad” es uno con una o más alteraciones en una o más HVR y/o regiones marco que produce una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo principal que no posee dicha alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno objetivo. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, Marks et ál. *Bio/Technology* 10:779-783, 1992 describen la maduración por afinidad mediante transposiciones de los dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de HVR y/o residuos marco se describen en: Barbas et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813, 1994; Schier et ál. *Gene* 169:147-155, 1995; Yelton et ál. *J. Immunol.* 155:1994-2004, 1995; Jackson et ál. *J. Immunol.* 154(7):3310-3319, 1995; y Hawkins et ál. *J. Mol. Biol.* 226:889-896, 1992.

El término “anticuerpo” se utiliza en la presente en el sentido más amplio y comprende varias estructuras de anticuerpo, que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad deseada de unión al antígeno.

Tal como se usa en la presente, “triptasa” hace referencia a cualquier triptasa natural de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. La triptasa se

conoce en la técnica también como triptasa de mastocitos, proteasa II de mastocitos, triptasa cutánea, triptasa pulmonar, triptasa pituitaria, proteinasa neutra de mastocitos y serina proteasa II de mastocitos. El término “triptasa” abarca triptasa alfa (codificada en seres humanos mediante *TPSAB1*), triptasa beta (codificada en seres humanos mediante *TPSAB1* y *TPSB2*; ver más adelante), triptasa delta (codificada en seres humanos mediante *TPSD1*), triptasa gamma (codificada en seres humanos mediante *TPSG1*) y triptasa épsilon (codificada en seres humanos mediante *PRSS22*). Las proteínas de triptasa alfa, beta y gamma son solubles, mientras que las proteínas de triptasa épsilon están ancladas en la membrana. La triptasa beta y gamma son proteasas de serina activas, aunque poseen especificidades distintas. Las proteínas de triptasa alfa y delta son proteasas mayormente inactivas, dado que poseen residuos en posiciones fundamentales que difieren de las proteasas de serina activas típicas. Un ejemplo de secuencia de proteína de longitud completa de triptasa alfa puede hallarse con el número de acceso de GenBank de NCBI ACZ98910.1 (SEQ ID NO: 118). Los ejemplos de secuencias de proteína de longitud completa de triptasa gamma pueden hallarse con el número de acceso de Uniprot Q9NRR2 o los números de acceso de GenBank Q9NRR2.3, AAF03695.1, NP\_036599.3 o AAF76457.1. Los ejemplos de secuencias de proteína de longitud completa de triptasa delta pueden hallarse con el número de acceso de Uniprot Q9BZJ3 o el número de acceso de GenBank NP\_036349.1. Varios genes de triptasa se acumulan en el cromosoma humano 16p13.3. La expresión abarca triptasa no procesada “de longitud completa” así como cualquier forma de triptasa que resulte del procesamiento en la célula. La triptasa beta es la triptasa principal expresada en mastocitos, mientras que la triptasa alfa es la triptasa principal expresada en basófilos. La triptasa alfa y la triptasa beta incluyen típicamente una secuencia líder de aproximadamente 30 aminoácidos y una secuencia catalítica de aproximadamente 245 aminoácidos (ver, por ejemplo, Schwartz, *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26:451-463, 2006).

Tal como se usa en la presente, “triptasa beta” hace referencia a cualquier triptasa beta natural de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. La triptasa beta es una proteasa de serina que es un componente principal de los gránulos secretorio de los mastocitos. Tal como se usa en la presente, el término abarca la triptasa

beta 1 (codificada por el gen *TPSAB1*, que también codifica la triptasa alfa 1), triptasa beta 2 (codificada por el gen *TPSB2*) y triptasa beta 3 (codificada también por el gen *TPSB2*). Un ejemplo de secuencia de triptasa humana beta 1 se muestra en la SEQ ID NO: 71 (ver también el número de acceso de GenBank NP\_003285.2). Un ejemplo de secuencia de triptasa humana beta 2 se muestra en la SEQ ID NO: 72 (ver también el número de acceso de GenBank AAD13876.1). Un ejemplo de secuencia de triptasa humana beta 3 se muestra en la SEQ ID NO: 73 (ver también el número de acceso de GenBank NP\_077078.5). La expresión triptasa beta abarca triptasa beta no procesada “de longitud completa”, así como triptasa beta que resulta de modificaciones postraduccionales, que incluyen procesamiento proteolítico. Se considera que la protriptasa beta de longitud completa se procesa en dos etapas proteolíticas. Primero se produce la escisión intermolecular autocatalítica en R<sup>-3</sup>, particularmente a pH ácido y en presencia de un polianión (por ejemplo, heparina o sulfato de dextrano). Luego se retira el pro’ dipéptido restante (probablemente con dipeptidil peptidasa I). Para la triptasa humana beta 1 de longitud completa, con respecto a la SEQ ID NO: 71 que figura a continuación, los residuos de aminoácidos subrayados corresponden a la secuencia líder natural, y los residuos de aminoácidos en negrita y sombreados corresponden al prodominio, que se escinden para formar la proteína madura (ver, por ejemplo, Sakai et ál. *J. Clin. Invest.* 97:988-995, 1996)

MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCG  
 GSLIHPQWVLTAACHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIAL  
 LELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFFPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMEN  
 HICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWG  
 EGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP (SEQ ID NO: 71).

La triptasa beta enzimáticamente activa madura es típicamente un homotetrámero o heterotetrámero, aunque se ha indicado un monómero activo (ver, por ejemplo, Fukuoka et ál. *J. Immunol.* 176:3165, 2006). Las subunidades del tetrámero de triptasa beta se unen mediante interacciones hidrofóbicas y polares entre las subunidades y se estabilizan mediante polianiones (particularmente heparina y sulfato de dextrano). El término triptasa puede hacer referencia a un tetrámero de triptasa o monómero de triptasa. Se muestran ejemplos de secuencia de triptasa humana beta 1, beta 2 y beta 3 en la SEQ ID NO: 97, la SEQ ID NO:

116 y la SEQ ID NO: 117, respectivamente. El sitio activo de cada subunidad se orienta hacia un poro central del tetrámero, que mide aproximadamente 50 x 30 angstroms (ver, por ejemplo, Pereira et ál. *Nature* 392:306-311, 1998). El tamaño del poro central limita típicamente el acceso de los sitios activos para los inhibidores. Los ejemplos de sustratos de triptasa beta incluyen, de modo no taxativo, PAR2, C3, fibrinógeno, fibronectina y quininógeno.

Las expresiones “anticuerpo contra triptasa”, “anticuerpo que se une a triptasa” y “anticuerpo que se une específicamente a triptasa” hacen referencia a un anticuerpo que puede unirse a triptasa con suficiente afinidad, de forma tal que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico y/o de diagnóstico al dirigirse a la triptasa. En una modalidad, el grado de la unión de un anticuerpo contra triptasa a una proteína que no sea triptasa no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a triptasa tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a triptasa posee una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\geq 1\mu\text{M}$ ,  $\geq 100\text{ nM}$ ,  $\geq 10\text{ nM}$ ,  $\geq 1\text{ nM}$ ,  $\geq 0.1\text{ nM}$ ,  $\geq 0.01\text{ nM}$  o  $\geq 0.001\text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8}\text{ M}$  o menos, por ejemplo, de  $10^{-8}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ , por ejemplo, de  $10^{-9}\text{ M}$  a  $10^{-13}\text{ M}$ ). En determinadas modalidades, un anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de triptasa que se conserva entre triptasa de diferentes especies.

Un “anticuerpo que se une al mismo epítipo” que un anticuerpo de referencia hace referencia a un anticuerpo que entra en contacto con un conjunto superpuesto de residuos de aminoácidos del antígeno en comparación con el anticuerpo de referencia o bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más o 90 % o más, en un ensayo de competencia. En algunas modalidades, el conjunto de residuos de aminoácidos con el que entró en contacto el anticuerpo puede superponerse de forma total o parcial con el conjunto de residuos de aminoácidos con los que entró en contacto el anticuerpo de referencia. En algunas modalidades, un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más o 90 % o más, en un ensayo de competencia y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno 50 % o más, 60 % o más, 70 % o más, 80 % o más o 90 % o más, en un

ensayo de competencia. Se proporciona en la presente un ejemplo de ensayo de competencia.

En el contexto de las reivindicaciones, la expresión “se determina mediante un ensayo de clasificación de epítomos” significa que se determina que un anticuerpo se une al mismo epítomo y/o compete para la unión a un anticuerpo contra triptasa de referencia (por ejemplo, hu31A.v11 o huE104.v2) mediante el uso del ensayo de clasificación de epítomos OCTET®, tal como se describe en el apartado C del Ejemplo 3. En resumen, la proteína monomérica de triptasa humana beta 1 se biotinila en el residuo Lys al reaccionar con NHS-PEG4-biotina. El monómero biotinilado se diluye a 5 µg/ml en amortiguador cinético (ForteBio, Inc.) y se inmoviliza en puntas de sensor de estreptavidina (ForteBio, Inc.). Luego de la etapa de inmovilización, los sensores inmovilizados con triptasa humana beta 1 se saturan con el primer anticuerpo, se diluyen 10-20 µg/ml, seguido por la unión con un segundo anticuerpo diluido a 2.5 µg/ml. La temperatura de ejecución de dichos ensayos de unión al epítomo es de 30 °C. Una señal de unión del segundo anticuerpo implica que los dos anticuerpos pueden unirse al antígeno de manera simultánea en epítomos separados no superpuestos, mientras que una ausencia de señal de unión implica que comparten un epítomo en común. En algunas instancias, se observa una señal parcial del segundo anticuerpo (es decir, la señal es menor que la señal observada si no se agregó el primer anticuerpo, pero mayor que el fondo), lo que implica que los epítomos se superponen parcialmente.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (ver patente estadounidense n.º 5,641,870, Ejemplo 2; Zapata et ál. *Protein Eng.* 8(10):1057-1062, 1995); moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, denominados fragmentos “Fab”, y un fragmento “Fc” residual, cuya denominación refleja la capacidad de cristalizarse con facilidad. El fragmento Fab consiste en una cadena L

completa junto con el dominio de región variable de la cadena H (VH) y el primer dominio constante de una cadena pesada ( $C_{H1}$ ). El tratamiento de un anticuerpo con pepsina produce un único fragmento  $F(ab')_2$  grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro con actividad de unión al antígeno divalente y que mantiene la capacidad de reticular antígenos. Los fragmentos  $Fab'$  difieren de los fragmentos Fab en que poseen pocos residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio  $C_{H1}$  que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo.  $Fab'$ -SH es la designación en la presente para  $Fab'$  en la cual el o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  se produjeron originalmente como pares de fragmentos  $Fab'$  con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

La expresión “región Fc” se utiliza en la presente para definir una región de extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que contiene al menos una parte de la región constante. La expresión incluye regiones Fc de secuencia natural y regiones Fc variantes. En una modalidad, una región Fc de cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo de la cadena pesada. Sin embargo, la lisina en el extremo C (Lys447) de la región Fc puede estar presente o no. A menos que se indique lo contrario en la presente, la numeración de los residuos de aminoácidos en la región Fc o región constante se realiza de acuerdo con el sistema de numeración EU, también denominado índice EU, tal como se describe en Kabat et ál. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.<sup>a</sup> ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

“Fv” consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de la cadena H y L) que contribuyen los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y le confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres H específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menudo a una afinidad menor que el sitio de unión

completo.

Los “Fv de cadena simple”, abreviados también como “sFv” o “scFv”, son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos VH y VL conectados a una única  
 5 cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende también un enlazador polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para un resumen de sFv, ver Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

10

El término “diacuerpos” hace referencia a pequeños fragmentos de anticuerpo preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (ver párrafo anterior) con enlazadores cortos (alrededor de 5-10 residuos) entre los dominios VH y VL, de manera que se logre el emparejamiento entre cadenas pero no dentro de las cadenas de los dominios V, lo que  
 15 produce un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que posee dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv “de entrecruzamiento” en los que los dominios VH y VL de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Se describen diacuerpos en mayor detalle, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448,  
 20 1993.

“Dominio de unión” significa una parte de un compuesto o una molécula que se une de forma específica a un epítipo, antígeno, ligando o receptor objetivo. Los dominios de unión incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, policlonales,  
 25 recombinantes, humanizados y quiméricos), fragmentos de anticuerpos o partes de estos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab’2, anticuerpos scFv, SMIP, anticuerpos de dominio, diacuerpos, minicuerpos, scFv-Fc, aficuerpos, nanocuerpos y doimnios VH y/o VL de anticuerpos), receptores, ligandos, aptámeros y otras moléculas con un compañero de unión identificado.

30

Un anticuerpo “bloqueador” o un anticuerpo “antagonista” es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno que une. Determinados anticuerpos bloqueadores o

antagonistas inhiben de forma sustancial o completa la actividad biológica del antígeno. En algunas modalidades, la actividad puede ser una actividad enzimática de triptasa, por ejemplo, actividad de proteasa. En otras modalidades, la actividad puede ser la estimulación mediada por triptasa de la proliferación celular del músculo liso bronquial y/o la contracción a base de colágeno. En otras instancias, la actividad puede ser la liberación de histamina de mastocitos (por ejemplo, liberación de histamina desencadenada por IgE y/o liberación de histamina desencadenada por triptasa). Un anticuerpo de la invención puede inhibir una actividad biológica de la triptasa al menos alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o alrededor de 100 %.

En el contexto de las reivindicaciones, la expresión “según se determina mediante un ensayo enzimático de triptasa humana beta con un péptido sintético S-2288 como sustrato”, significa que la actividad de inhibición se mide de acuerdo con el ensayo descrito en el Ejemplo 1(A)(viii)(a). En resumen, la enzima activa del tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante se diluye a 0.75 nM en amortiguador TNH (Tris 200 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/mL de heparina, TRITON™ X-100 al 0.01 %, pH 8.0) y se combina 1:1 con anticuerpos contra triptasa (diluidos en PBS) en placas de 384 pocillos. Se incuban las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve. El sustrato colorimétrico S-2288 (Chromogenix, parte n.º 82-0852-39) o un sustrato equivalente, se diluye a 1200 µM en amortiguador TNH y se agrega a la placa. Las concentraciones finales en los pocillos son de 400 µM de S-2288, 0.25 nM de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante, 66 µg/mL de heparina y de 0.10 a 222 nM de anticuerpo contra triptasa. Las placas se incuban durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y luego se leen a A<sub>405</sub>. La IC<sub>50</sub> de los anticuerpos contra triptasa se determina a partir de un ajuste de cuatro parámetros de sus curvas respectivas.

30

La “clase” de un anticuerpo hace referencia al tipo de dominio constante o región constante

que posee su cadena pesada. Existen cinco clases principales de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub>. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ ,  
5 respectivamente.

Las “funciones efectoras” del anticuerpo hacen referencia a las actividades biológicas que pueden atribuirse a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían según el isotipo de anticuerpo. Los  
10 ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complementos; unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

15 La “citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos” o “ADCC” hace referencia a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células citolíticas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula objetivo que porta antígenos y, posteriormente, destruyan la  
20 célula objetivo con citotoxinas. Los anticuerpos “cargan” las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células principales para mediar la ADCC, células NK, solo expresan Fc $\gamma$ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch et ál. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Para evaluar la actividad  
25 de ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente estadounidense n.º 5,500,362 o 5,821,337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De manera alternativa o adicional, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por  
30 ejemplo, en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998.

“Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y formas sometidas de manera alternativa al corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que poseen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en el inmunorreceptor de tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en el inmunorreceptor tirosina (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplasmático (ver reseña en M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234, 1997). Los FcR se analizan, por ejemplo, en Ravetch et ál. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Capel et ál. *Immunomethods* 4:25-34, 1994; y de Haas et ál. *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41, 1995. Otros FcR, incluidos los que se identifiquen en el futuro, están abarcados por el término “FcR” de la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (ver, por ejemplo, Guyer et ál. *J. Immunol.* 117:587, 1976; y Kim et ál. *J. Immunol.* 24:249, 1994).

Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y llevan a cabo funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y desempeñan una función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células citolíticas naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; se prefieren las células PBMC y NK. Las células efectoras pueden aislarse a partir de una fuente natural, por ejemplo, de la sangre.

La “citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” hace referencia a la lisis de una célula objetivo en presencia de un complemento. La activación de la vía de complemento clásica comienza mediante la unión del primer componente del sistema de complementos (C1q) a anticuerpos (de la subclase adecuada) que se unen a su antígeno cognado. Para evaluar la activación del complemento, puede llevarse a cabo un ensayo de CDC, por

ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro et ál. *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996.

Un “epítopo” es la parte del antígeno a la cual se une el anticuerpo de manera selectiva. Para un antígeno de polipéptido, un epítopo lineal puede ser una parte de un péptido de alrededor de 4-15 (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, residuos de aminoácidos. Un epítopo conformacional no lineal puede comprender residuos de una secuencia de polipéptidos que se acerque a la estructura tridimensional (3D) de la proteína. En algunas modalidades, el epítopo comprende aminoácidos que se encuentran a menos de 4 angstroms (Å) de cualquier átomo de un anticuerpo. En algunas modalidades, el epítopo comprende aminoácidos de un protómero de triptasa que se encuentran a menos de 4 Å de cualquier átomo de un Fab compañero. En determinadas modalidades, el epítopo comprende aminoácidos que se encuentran a menos de 3.5 Å, 3 Å, 2.5 Å o 2 Å de cualquier átomo de un anticuerpo. Los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que entra en contacto con un antígeno (es decir, parátopo) pueden determinarse, por ejemplo, al determinar la estructura cristalina del anticuerpo en complejo con el antígeno o al realizar un intercambio de hidrógeno/deuterio.

Al utilizarse en el contexto de las reivindicaciones, la expresión “el epítopo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X” significa que se determina que un átomo de un residuo de aminoácido de triptasa (por ejemplo, residuo de triptasa humana beta 1) se encuentra a menos de 4 Å de cualquier átomo de un anticuerpo contra triptasa (por ejemplo, cualquier anticuerpo contra triptasa descrito en la presente, por ejemplo, hu31A.v11 o huE104.v2) en un modelo de cristalografía de rayos X, por ejemplo, según se describe en el Ejemplo 3. En algunas modalidades, el modelo de cristalografía de rayos X posee una resolución de alrededor de 3.5 Å o menor, alrededor de 3 Å o menor, alrededor de 2.5 Å o menor, alrededor de 2.15 Å o menor, o alrededor de 2 Å o menor.

Las expresiones “anticuerpo de longitud completa”, “anticuerpo intacto” y “anticuerpo completo” se utilizan en la presente de manera indistinta para hacer referencia a un anticuerpo que posee una estructura sustancialmente similar a la estructura de un anticuerpo natural o que posee cadenas pesadas que contienen una región Fc tal como se define en la presente.

Un “anticuerpo humano” es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un humano y/o confeccionado mediante el uso de las técnicas para la fabricación de anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión al antígeno no humanos.

Un “marco de consenso humano” es un marco que representa los residuos de aminoácidos más comunes en una selección de secuencias de marco VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana se realiza a partir de un subgrupo de secuencias de dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias de dominio variable es un subgrupo según Kabat et ál. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación de NIH 91-3242, Bethesda MD, vols. 1-3, 1991. En una modalidad, para el VL, el subgrupo es un subgrupo kappa III o kappa IV como en Kabat et ál., *supra*. En una modalidad, para el VH, el subgrupo es un subgrupo III según Kabat et ál., *supra*.

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima cantidad de secuencia derivada del anticuerpo no humano. Mayormente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se remplazan con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como ratón, rata, conejo o primate no humano, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan con los residuos no humanos correspondientes. Asimismo, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallan en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, donde todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprende opcionalmente al

menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Por detalles adicionales, ver Jones et ál. *Nature* 321:522-525, 1986; Riechmann et ál. *Nature* 332:323-329, 1988; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, 1992.

- 5 Un “inmunoconjugado” es un anticuerpo conjugado con una o más moléculas heterólogas, que incluyen de modo no taxativo, un agente citotóxico.

El término “aislado”, cuando se usa para describir los diversos anticuerpos descritos en la presente, significa un anticuerpo que se identificó y separó, y/o recuperó, de una célula o  
10 cultivo celular a partir del cual se expresó. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas modalidades, un anticuerpo se purifica hasta más del 95 % o 99 % de pureza según se determina, por ejemplo, mediante métodos electroforéticos (por ejemplo,  
15 electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), isoelectroenfoque (IEF, por sus siglas en inglés), electroforesis capilar) o cromatográficos (por ejemplo, HPLC de intercambio iónico o de fase inversa). Para una reseña de los métodos de evaluación de la pureza de un anticuerpo, ver, por ejemplo, Flatman et ál. *J. Chromatogr. B* 848:79-87, 2007. En modalidades preferidas, el anticuerpo se purifica (1) hasta un grado  
20 suficiente que permita obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante el uso de un secuenciador de vaso giratorio o (2) hasta lograr homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones de reducción o no, utilizando tinción con Coomassie blue o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes, dado que al menos un componente del  
25 entorno natural del polipéptido no se encuentra presente. No obstante, generalmente el polipéptido aislado se prepara mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se usa en la presente, la expresión “anticuerpo monoclonal” hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir,  
30 los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítopo en un antígeno, a excepción de los anticuerpos variantes posibles, por ejemplo, que

contienen mutaciones naturales o que surgen durante la producción de una preparación de anticuerpos monoclonales, donde dichas variantes generalmente están presentes en cantidades mínimas. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos),

5 cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante sobre un antígeno. Por lo tanto, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se debe interpretar que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método específico. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a

10 utilizar de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante diversas técnicas que incluyen, de modo no taxativo, el método del hibridoma, métodos de ADN recombinante, métodos de expresión en fagos y métodos que utilizan animales transgénicos que contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana; en la presente se describen dichos métodos y otros ejemplos de métodos para elaborar anticuerpos monoclonales. En

15 determinadas modalidades, la expresión “anticuerpo monoclonal” abarca anticuerpos biespecíficos.

La expresión “anticuerpo bivalente” hace referencia a un anticuerpo que posee dos sitios de unión para el antígeno. Un anticuerpo bivalente puede ser, de modo no taxativo, en el formato

20 de la IgG o en el formato de  $F(ab')_2$ .

La expresión “anticuerpo multiespecífico” se utiliza en el sentido más amplio y abarca un anticuerpo que se une a dos o más determinantes o epítomos en un antígeno o dos o más determinantes o epítomos en más de un antígeno. Estos anticuerpos multiespecíficos incluyen,

25 de modo no taxativo, anticuerpos de longitud completa, anticuerpos que poseen dos o más dominios de VL y VH, fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fv, dsFv, scFv, diacuerpos, diacuerpos y triacuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo enlazados de forma covalente o no covalente. “Especificidad poliepitópica” hace referencia a la capacidad de unirse de forma específica a dos o más epítomos diferentes en uno o más objetivos iguales o

30 distintos. En determinadas modalidades, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico. “Especificidad doble” o “biespecificidad” hace referencia a la capacidad de unirse

de forma específica a dos epítomos distintos en uno o más objetivos iguales o distintos. Sin embargo, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos, los anticuerpos específicos dobles tienen dos grupos de unión al antígeno que son idénticos en la secuencia de aminoácidos y cada grupo Fab puede reconocer dos antígenos. La especificidad doble permite que los anticuerpos interactúen con gran afinidad con dos antígenos diferentes como una molécula de un solo Fab o IgG. De acuerdo con una modalidad, el anticuerpo multiespecífico se une a cada epítomo con una afinidad de 5  $\mu\text{M}$  a 0.001 pM, 3  $\mu\text{M}$  a 0.001 pM, 1  $\mu\text{M}$  a 0.001 pM, 0.5  $\mu\text{M}$  a 0.001 pM o 0.1  $\mu\text{M}$  a 0.001 pM. “Monoespecífico” hace referencia a la capacidad de unirse a un solo epítomo.

10

Un “anticuerpo no conjugado” hace referencia a un anticuerpo que no está conjugado con un resto heterólogo (por ejemplo, un resto citotóxico) o radiomarcador. El anticuerpo no conjugado puede estar presente en una composición farmacéutica.

15 Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula objetivo, la expresión “se une”, “unión”, “unión específica” o “específico de” un polipéptido o epítomo particular en un objetivo de polipéptido en particular significa una unión perceptiblemente diferente a una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, al determinar la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión  
20 específica puede determinarse mediante competencia con una molécula de control similar al objetivo, por ejemplo, un objetivo sin marcar en exceso. En este caso, la unión específica se indica si la unión del objetivo marcado a una sonda se inhibe de forma competitiva mediante el objetivo sin marcar en exceso. Tal como se usa en la presente, la expresión “unión específica”, “se une específicamente” o “específico de” un polipéptido en particular o un  
25 epítomo en un objetivo de polipéptido en particular puede presentarse, por ejemplo, con una molécula que posea una  $K_D$  para el objetivo de  $10^{-4}$  M o menor, alternativamente  $10^{-5}$  M o menor, alternativamente  $10^{-6}$  M o menor, alternativamente  $10^{-7}$  M o menor, alternativamente  $10^{-8}$  M o menor, alternativamente  $10^{-9}$  M o menor, alternativamente  $10^{-10}$  M o menor, alternativamente  $10^{-11}$  M o menor, alternativamente  $10^{-12}$  M o menor, o una  $K_D$  dentro del  
30 intervalo de  $10^{-4}$  M a  $10^{-6}$  M, de  $10^{-6}$  M a  $10^{-10}$  M o de  $10^{-7}$  M a  $10^{-9}$  M. Como comprenderá el experto en la técnica, los valores de  $K_D$  y afinidad están relacionados de manera inversa. Una

gran afinidad con respecto a un antígeno se mide a través de un valor bajo de  $K_D$ . En una modalidad, la expresión “unión específica” hace referencia a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo del polipéptido.

5

Por “parátipo” se entiende la parte de un anticuerpo que se une al epítipo de un antígeno. El parátipo es típicamente una región de alrededor de 15-22 residuos de aminoácidos de la región Fv del anticuerpo y puede contener aminoácidos de las cadenas  $V_H$  y  $V_L$  del anticuerpo.

- 10 El término “variable” hace referencia a que determinados segmentos de los dominios variables difieren en gran medida en cuanto a la secuencia entre anticuerpos. El dominio variable o “V” media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular con respecto a su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme en una extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. Por el contrario, las regiones V
- 15 consisten en extensiones relativamente invariables denominadas regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables”, cada una con 9-12 aminoácidos de longitud. Cuando se utiliza en la presente, la expresión “región hipervariable” o “HVR” hace referencia a residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región
- 20 hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos, por ejemplo, aproximadamente alrededor de los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en la VL, y aproximadamente alrededor de los residuos 26-35 (H1), 49-65 (H2) y 95-102 (H3) en la VH (en una modalidad, H1 se encuentra aproximadamente alrededor de los residuos 31-35); Kabat et ál. *supra*) y/o esos residuos de un “bucle hipervariable” (por ejemplo, residuos 26-32
- 25 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en la VL y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en la VH; Chothia et ál. *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987. Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprende cuatro FR, que adoptan principalmente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos integran, la estructura de lámina beta. Las regiones
- 30 hipervariables de cada cadena se mantienen a gran proximidad mediante las FR y, junto con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al

antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et ál. *supra*). Por consiguiente, las secuencias de HVR y FR generalmente aparecen en la siguiente secuencia en VH (o VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

Las expresiones “numeración de residuo de dominio variable según Kabat” o “numeración de posición de aminoácido según Kabat” y las variaciones de estas hacen referencia al sistema de numeración usado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos de Kabat et ál. *supra*. Al utilizar este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener una cantidad menor o adicional de aminoácidos que corresponden a un acortamiento, o una inserción, en una FR o una HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a, de acuerdo con Kabat) luego del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc., de acuerdo con Kabat) luego del residuo 82 de FR de cadena pesada. Es posible determinar la numeración de residuos de Kabat para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat “estándar”.

El sistema de numeración de Kabat se utiliza generalmente cuando se hace referencia a un residuo del dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat et ál. *supra*). Generalmente se utiliza el “sistema de numeración EU” o “índice EU” cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU indicado en Kabat et ál., *supra*). El “índice EU como se establece en Kabat” hace referencia a la enumeración de residuos del anticuerpo EU de IgG1 humana. A menos que se indique lo contrario en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio variable de los anticuerpos significan la numeración del residuo según el sistema de numeración Kabat. A menos que se indique lo contrario en la presente, las referencias a los números de residuos en el dominio constante de los anticuerpos significan la numeración de residuos según el

sistema de numeración EU (por ejemplo, véase la solicitud estadounidense provisional n.º 60/640,323, Figuras para la numeración EU).

Un “trastorno” o “enfermedad” es cualquier estado que se beneficie del tratamiento con el anticuerpo (por ejemplo, cualquier anticuerpo contra triptasa descrito en la presente). Esto incluye trastornos o enfermedades crónicos y graves que incluyen las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno pulmonar. En algunos ejemplos, un trastorno puede ser un trastorno asociado a triptasa o un trastorno mediado por triptasa.

Tal como se utilizan en la presente, las expresiones “trastorno asociado a triptasa” y “trastorno mediado por triptasa” hacen referencia a cualquier trastorno o afección mediado por triptasa o asociado a esta. En algunas modalidades, los trastornos asociados a triptasa se asocian a una actividad o a niveles de triptasa excesivos en los que pueden manifestarse síntomas atípicos debido a los niveles o a la actividad de triptasa de forma local y/o sistémica en el cuerpo.

En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma grave crónica y persistente con episodios graves de síntomas agravados (exacerbaciones) que pueden poner en riesgo la vida. En algunas modalidades, el asma es asma atópica (también conocida como alérgica), asma no alérgica (por ejemplo, a menudo desencadenado por una infección con un virus respiratorio (por ejemplo, influenza, parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus humano y virus sincitial respiratorio) o irritante inhalado (contaminantes atmosféricos, smog, partículas de diésel, químicos volátiles y gases interiores o al aire libre, o incluso por aire frío seco).

En algunas modalidades, el asma es intermitente o inducida por ejercicio, asma debido a exposición primaria crónica o aguda, exposición de segunda mano a “humo” (típicamente cigarrillos, cigarros, pipas), inhalación o uso de “vaporizadores” (tabaco, marihuana u otras sustancias de este tipo) o asma desencadenada por la ingesta reciente de aspirina o AINE relacionados. En algunas modalidades, el asma es leve o asma sin tratamiento de corticosteroides, asma recientemente diagnosticada y sin tratar, o que no haya precisado previamente el uso crónico de esteroides sistémicos o tópicos inhalados para controlar los síntomas (tos, sibilancias, dificultad para respirar/falta de aliento o dolor de pecho). En algunas modalidades, el asma es crónica, asma resistente a corticosteroides, asma refractaria a corticosteroides, asma no controlada con corticosteroides u otros medicamentos de control del asma.

En algunas modalidades, el asma es asma moderada a grave. En determinadas modalidades, el asma es asma con contenido elevado de Th2. En algunas modalidades, el asma es asma grave. En algunas modalidades, el asma es asma atópica, asma alérgica, asma no alérgica (por ejemplo, debido a infección y/o virus sincitial respiratorio (RSV)), asma inducida por ejercicio, asma exacerbada/sensible a la aspirina, asma leve, asma moderada a grave, asma no tratada con corticosteroides, asma crónica, asma resistente a corticosteroides, asma refractaria a corticosteroides, asma recientemente diagnosticada y sin tratar, asma debido a tabaquismo, asma sin controlar con corticosteroides. En algunas modalidades, el asma es de linfocitos auxiliares T de tipo 2 (Th2), de tipo 2 (Th2) elevado o asma provocada por tipo 2 (T2). En algunas modalidades, el asma es asma eosinofílica. En algunas modalidades, el asma es asma alérgica. En algunas modalidades, se determinó que el individuo es positivo para inflamación eosinofílica (EIP, por sus siglas en inglés). Ver WO 2015/061441. En algunas modalidades, el asma es asma con alto contenido de periostina (por ejemplo, posee un nivel de periostina al menos alrededor de cualquiera de 20 ng/mL, 25 ng/mL o 50 ng/mL en suero). En algunas modalidades, el asma es asma con eosinófilos elevados (por ejemplo, al menos alrededor de cualquiera de 150, 200, 250, 300, 350, 400 conteos de eosinófilos/ml de sangre). En determinadas modalidades, el asma es asma con Th2 bajo o asma no provocada por Th2. En algunas modalidades, se determinó que el individuo es negativo para inflamación

eosinofílica (EIN, por sus siglas en inglés). Ver WO 2015/061441. En algunas modalidades, el asma es asma con bajo contenido de periostina (por ejemplo, posee un nivel de periostina menor que alrededor de 20 ng/mL en suero). En algunas modalidades, el asma es asma con bajo contenido de eosinófilos (por ejemplo, menor que alrededor de 150 conteos de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre o menor que alrededor de 100 conteos de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre).

Tal como se usa en la presente, la expresión “asma con Th2 elevado” hace referencia a asma que presenta niveles elevados de una o más citocinas relacionadas con células Th2, por ejemplo, IL13, IL4, IL9, IL5, o que presenta inflamación asociada con citocina Th2. En determinadas modalidades, la expresión asma con contenido elevado de Th2 puede utilizarse de manera intercambiable con asma con alto contenido de eosinófilos. En determinadas modalidades, el asma con contenido elevado de Th2 es asma provocada por Th2. En algunas modalidades, se determinó que el paciente con asma es positivo para inflamación eosinofílica (EIP). Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2015/061441, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee niveles elevados de al menos uno de los genes con distintivo eosinofílico en comparación con un control o nivel de referencia. Ver WO2015/061441. En determinadas modalidades, el asma con contenido elevado de Th2 es asma con contenido elevado de periostina. En algunas modalidades, el individuo posee un contenido de periostina en suero elevado. En determinadas modalidades, el individuo tiene dieciocho años o más. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un nivel elevado de periostina en suero en comparación con un control o nivel de referencia. En determinadas modalidades, el control o nivel de referencia es la mediana del nivel de periostina en una población. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee 20 ng/ml o más de periostina en suero. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee 25 ng/ml o más de periostina en suero. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee 50 ng/ml o más de periostina en suero. En determinadas modalidades, el control o nivel de referencia de periostina en suero es 20 ng/ml, 25 ng/ml o 50 ng/ml. En determinadas modalidades, el asma es asma con contenido elevado de eosinófilos. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo elevado de eosinófilos en comparación con un control o nivel de referencia. En determinadas

modalidades, el control o nivel de referencia es la mediana del nivel de una población. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 150 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 200 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 250 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 300 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 350 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 400 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 450 o mayor. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 500 o mayor. En determinadas modalidades preferidas, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre de 300 o mayor. En determinadas modalidades, los eosinófilos son eosinófilos de sangre periférica. En determinadas modalidades, los eosinófilos son eosinófilos de esputo. En determinadas modalidades, el individuo presenta un nivel elevado de FeNO (ácido nítrico exhalado fraccional) y/o un nivel elevado de IgE. Por ejemplo, en algunas instancias, el individuo presenta un nivel de FeNO por encima de alrededor de 250 partes por mil millones (ppb), mayor que alrededor de 275 ppb, mayor que alrededor de 300 ppb, mayor que alrededor de 325 ppb, mayor que alrededor de 325 ppb o mayor que alrededor de 350 ppb. En algunas instancias, el individuo posee un nivel de IgE por encima de 50 IU/ml.

Tal como se usa en la presente, la expresión “asma con Th2 bajo” o “asma sin Th2 elevado” hace referencia a asma que presenta niveles bajos de una o más citocinas relacionadas con células Th2, por ejemplo, IL13, IL4, IL9, IL5, o que presenta inflamación asociada con citocina que no es Th2. En determinadas modalidades, la expresión asma con contenido bajo de Th2 puede utilizarse de manera intercambiable con asma con contenido bajo de eosinófilos. En algunas modalidades, se determinó que el paciente con asma es negativo para inflamación eosinofílica (EIN). Ver, por ejemplo, WO 2015/061441. En determinadas modalidades, el asma con contenido bajo de Th2 es asma provocado por Th17. En determinadas modalidades, el asma con contenido bajo de Th2 es asma con contenido bajo de periostina.

En determinadas modalidades, el individuo tiene dieciocho años o más. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un nivel reducido de periostina en suero en comparación con un control o nivel de referencia. En determinadas modalidades, el control o nivel de referencia es la mediana del nivel de periostina en una población. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee menos de 20 ng/ml de periostina en suero. En determinadas modalidades, el asma es asma con contenido bajo de eosinófilos. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo reducido de eosinófilos en comparación con un control o nivel de referencia. En determinadas modalidades, el control o nivel de referencia es el nivel promedio de una población. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre menor que 150. En determinadas modalidades, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre menor que 100. En determinadas modalidades preferidas, se determinó que el individuo posee un conteo de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre menor que 300.

15

En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es esofagitis (por ejemplo, esofagitis eosinofílica), rinitis alérgica, rinitis no alérgica, rinosinusitis con pólipos, poliposis nasal, bronquitis, neumonía crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, inflamación de las vías aéreas, rinitis alérgica, bronquiectasia y/o bronquitis crónica.

20

En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es artritis. En algunas modalidades, la artritis es artritis reumatoide. En algunas modalidades, la artritis es osteoartritis, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artritis temprana, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, artritis enteropática, artritis reactiva, artritis psoriática y/o artritis como resultado de una lesión.

25

30

En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno

fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es una afección inflamatoria gastrointestinal. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es IBD (enfermedad intestinal inflamatoria), colitis ulcerosa (UC, por sus siglas en inglés), enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés), colitis (por ejemplo, colitis provocada por condicionamiento ambiental (por ejemplo, provocada por un régimen terapéutico o asociada con este, tal como quimioterapia, terapia de radiación, etc.)), colitis infecciosa, colitis isquémica, colitis colagenosa o linfocítica, enterocolitis necrosante, colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica o celiacía, alergias alimentarias, gastritis, gastroenteritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica con infección de *Helicobacter pylori*), esofagitis y otras formas de inflamación gastrointestinal provocada por un agente infeccioso o colitis indeterminada.

En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es una afección inflamatoria gastrointestinal. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es IBD (enfermedad intestinal inflamatoria). En algunas modalidades, la enfermedad intestinal inflamatoria es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis (por ejemplo, colitis provocada por condicionamiento ambiental (por ejemplo, provocada por un régimen terapéutico o asociada con este, tal como quimioterapia, terapia de radiación, etc.)), colitis infecciosa, colitis isquémica, colitis colagenosa o linfocítica, enterocolitis necrosante, colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica o celiacía, alergias alimentarias, gastritis, gastroenteritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica con infección de *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal provocada por un agente infeccioso o colitis indeterminada. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis ulcerosa (UC). En algunas modalidades, la colitis ulcerosa es colitis distal leve a moderada. En algunas modalidades, la colitis ulcerosa es colitis extensiva leve a moderada. En algunas modalidades, la colitis ulcerosa es colitis grave. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la

enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de enfermedad grave. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de remisión clínica inducida. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de remisión/respuesta mantenida. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad leve a moderada.

5 En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad moderada a grave. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad grave/fulminante. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad ileal, ileocolónica o colónica.

10 En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico, o trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de músculo liso, epitelios o endotelios) es

15 lupus o lupus eritematoso sistémico (SLE, por sus siglas en inglés), o una o más manifestaciones de lupus específicas del órgano (por ejemplo, lupus nefrítico (LN) que afecta el riñón o lupus extrarrenal (ERL, por sus siglas en inglés) que afecta la sangre y/u órganos linfoides (nódulos linfáticos, bazo, timo y vasos linfáticos asociados), y/o articulaciones y/u otros órganos, pero no necesariamente el riñón).

20 En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio o trastorno fibrótico se relaciona con sepsis y/o traumatismo, infección de VIH o idiopática (de etiología desconocida) tal como vasculitis asociada con ANCA (AAV, por sus siglas en inglés), granulomatosis con poliangiitis (conocida anteriormente como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, enfermedad cardiovascular, bronquitis eosinofílica, síndrome de

25 Reiter, síndrome de SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), espondilitis anquilosante, dermatomiositis, escleroderma, por ejemplo, escleroderma sistémico, denominado también esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, arteritis de células gigantes (GCA, por sus siglas en inglés), denominada también arteritis temporal, arteritis cranial o enfermedad de Horton), miositis, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, arteritis,

30 polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis de placa, psoriasis guttate, psoriasis inversa, psoriasis

pustulosa, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, pénfigo, por ejemplo, pénfigo vulgar, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, miastemia grave, celiaquía, esclerosis múltiple (EM) de subtipo recidivante-remitente (EMRR) o primaria progresiva (EMPP) o secundaria progresiva (EMSP), enfermedad de Guillain-Barre, diabetes mellitus de Tipo I (T1DM) o DM insulino dependiente (IDDM) o de tipo juvenil, tiroiditis (por ejemplo, enfermedad de Graves), enfermedad celíaca, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de mialgia, síndrome hipereosinofílico, reacciones edematosas que incluyen angioedema episódico, infecciones por helminto, dermatitis oncocercal, esofagitis eosinofílica, enteritis eosinofílica, colitis eosinofílica, apnea del sueño obstructiva, fibrosis de endomiocardio, enfermedad de Addison, fenómeno o enfermedad de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) o rechazo de trasplantes de órganos.

En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno inflamatorio de la piel. En algunas modalidades, el trastorno es dermatitis atópica o dermatitis oncocercal. En algunas modalidades, el trastorno es urticaria idiopática crónica (CIU o CSU).

En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es un trastorno fibrótico. En algunas modalidades, los trastornos fibróticos incluyen fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (por ejemplo, fibrosis asociada con cirrosis (por ejemplo, cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por virus, cirrosis posterior a hepatitis C y cirrosis biliar primaria), esquistosomiasis, colangitis (por ejemplo, colangitis esclerosante) y hepatitis autoinmunitaria), fibrosis renal (por ejemplo, fibrosis tubulointersticial, escleroderma, nefritis diabética y nefritis glomerular), fibrosis dérmica (por ejemplo, escleroderma, cicatrices hipertróficas y queloides, dermatopatía nefrogénica fibrosante y quemaduras), mielofibrosis, neurofibromatosis, fibroma, fibrosis intestinal y adhesiones fibróticas resultantes de intervenciones quirúrgicas), fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis asociada con infarto de miocardio), fibrosis vascular (por ejemplo, fibrosis asociada con aterosclerosis y restenosis arterial posangioplastia), fibrosis ocular (por ejemplo, fibrosis asociada con poscirugía de cataratas, vitreoretinopatía proliferativa y fibrosis retroorbital) y fibrosis de médula ósea (por ejemplo, mielofibrosis idiopática y mielofibrosis inducida por fármacos). La fibrosis puede ser específica de un órgano o sistémica (por

ejemplo, esclerosis sistémica y fibrosis asociada con GVHD). En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es neumonía intersticial fibrosante. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (IPF), también conocida como alveolitis fibrosante criptogénica. En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa I de género, edad y fisiología (GAP, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa II de GAP. En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa III de GAP. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es IPF esporádica. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar familiar. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar combinada y enfisema. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar se asocia con uno o más de los siguientes: neumonía intersticial usual; neumonía intersticial idiopática; neumonía intersticial descamativa; bronquiolitis respiratoria-enfermedad pulmonar intersticial; neumonía intersticial grave; neumonía intersticial no específica; sarcoidosis; neumonía organizada criptogénica; neumonía eosinofílica; infección; exposición a agentes ocupacionales o ambientales; tabaquismo; enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos o radiación; enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedades reumáticas; neumonía intersticial linfocítica; fibroelastosis pleuropulmonar; histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; esclerosis sistémica-enfermedad pulmonar intersticial; síndrome de Hermansky-Pudlak; y telomeropatía.

En algunas modalidades, el trastorno pulmonar, trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría A de la iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GOLD, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría B de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría C de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría D de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC es bronquitis crónica. En algunas modalidades, la EPOC es enfisema. En algunas modalidades, el enfisema es enfisema acinar proximal, panacinar o acinar distal. En algunas modalidades, el enfisema es enfisema inducido por tabaquismo. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con la exposición a particulados de polvo, vapores químicos

y/o contaminación del aire. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con una alteración del desarrollo pulmonar. En algunas modalidades, la EPOC es asma obstructiva crónica. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con una deficiencia de antitripsina alfa-1. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con la alteración del inhibidor de la serina proteasa

5 clado E, miembro 2 (SERPINE2). En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con inflamación sistémica persistente. En algunas modalidades, la EPOC es EPOC eosinofílica o con alto contenido de linfocitos T auxiliares de tipo 2 (T<sub>H</sub>2). En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con colonización bacteriana persistente. En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con exacerbaciones frecuentes. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario,

10 trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es síndrome de superposición de asma-EPOC (ACOS). En algunas modalidades, el ACOS es ACOS con eosinófilos predominantes, neutrófilos predominantes, de patrón mixto o sin inflamación (paucigranulocitario). En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario,

15 trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es síndrome de superposición de EPOC-apnea obstructiva del sueño (OSA).

Las listas que anteceden son listas no taxativas y el experto en la técnica comprenderá que una enfermedad o un trastorno puede incluirse en diversas categorías.

- 20 La expresión “prospecto del envase” se utiliza para hacer referencia a las instrucciones que suelen incluirse en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información acerca de las indicaciones, uso, dosificación, administración, terapia de combinación, contraindicaciones y/o advertencias concernientes al uso de dichos productos terapéuticos.
- 25 Las expresiones “formulación farmacéutica” y “composición farmacéutica” se utilizan de manera intercambiable en la presente y hacen referencia a una preparación en forma tal que permite que la actividad biológica de un ingrediente activo contenido en esta sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al cual se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles. En una modalidad
- 30 preferida, la composición farmacéutica o formulación farmacéutica se administra a un sujeto humano.

Una formulación farmacéutica “estéril” es aséptica o carece, o carece esencialmente, de todo microorganismo vivo y sus esporas.

- 5 Una formulación farmacéutica “estable” es una en la que la proteína (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra triptasa) de esta conserva esencialmente su estabilidad física, estabilidad química y/o actividad biológica al almacenarse. Preferentemente, la formulación conserva esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica al almacenarse. El período de almacenamiento se selecciona generalmente en  
10 función de la vida útil prevista de la formulación. Se encuentran disponibles en la técnica varios métodos analíticos para medir la estabilidad proteica y se analizan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una cantidad seleccionada de exposición de luz y/o temperatura  
15 seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. La estabilidad puede evaluarse de forma cualitativa y/o cuantitativa en una variedad de formas distintas, que incluyen la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño, al medir la turbidez y/o mediante inspección visual); evaluación de la formación de ROS (por ejemplo, mediante el uso de un ensayo de estrés de luz o un ensayo  
20 de estrés de AAPH); oxidación de residuos de aminoácidos específicos de la proteína (por ejemplo, un residuo de Trp y/o un residuo de Met de un anticuerpo monoclonal); evaluación de la heterogeneidad de carga mediante el uso de cromatografía de intercambio catiónico, isoelectroenfoque capilar de imagen (icIEF) o electroforesis de zona capilar; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis de espectrometría de masa; análisis  
25 SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis de mapa de péptidos (por ejemplo, trípticos o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o función de unión al objetivo de la proteína (por ejemplo, función de unión al antígeno de un anticuerpo) y similares. La inestabilidad puede implicar uno o más de: acumulación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met y/u oxidación de  
30 Trp), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteínas no

emparejadas, extensión del extremo N, procesamiento del extremo C, diferencias de glicosilación y similares.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa) “conserva su estabilidad física” en una formulación farmacéutica si no muestra signos o muestra muy poca acumulación, precipitación, fragmentación y/o desnaturalización en el examen visual del color y/o transparencia, o según se mide a través de dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa) “conserva la estabilidad química” en una fórmula farmacéutica, si la estabilidad química en un momento determinado es tal que se considera que el anticuerpo todavía conserva su actividad biológica tal como se define a continuación. La estabilidad química puede evaluarse al detectar y cuantificar formas químicamente alteradas del anticuerpo. La alteración química puede implicar la oxidación proteínica, que puede evaluarse mediante el uso de mapeo de péptidos triptico, cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (HPLC) y cromatografía líquida - espectrometría de masas (LC/MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen la alteración de la carga del anticuerpo, que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico o icIEF, por ejemplo.

Un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa) “conserva su actividad biológica” en una formulación farmacéutica si la actividad biológica del anticuerpo en un momento determinado se encuentra dentro de alrededor de 20 % (tal como dentro de alrededor de 10 %) de la actividad biológica presentada al momento en que se preparó la formulación farmacéutica (dentro de los errores del ensayo), según se determina, por ejemplo, en un ensayo de unión al antígeno o un ensayo de inhibición in vitro para un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra triptasa). En algunas modalidades, la actividad biológica de un anticuerpo en un momento determinado es menor que alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 % de la actividad biológica presentada al momento en que se preparó la formulación farmacéutica.

Tal como se usa en la presente, la “actividad biológica” de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa) hace referencia a la capacidad del anticuerpo de unirse a su objetivo, por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo monoclonal de unirse a un antígeno.

- 5 Puede incluir además una respuesta biológica que puede medirse *in vitro* o *in vivo*. Dicha actividad puede ser antagonista o agonista.

Una proteína (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo contra triptasa) que es “susceptible a oxidación” es una que comprende uno o más residuos que se halló que son propensos a la oxidación, tal como, de modo no taxativo, metionina (Met), cisteína (Cys),  
10 histidina (His), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Por ejemplo, un aminoácido de triptófano en la parte Fab de un anticuerpo monoclonal o un aminoácido de metionina en la parte Fc de un anticuerpo monoclonal pueden ser susceptibles a oxidación.

- 15 La expresión “porcentaje de oxidación” hace referencia al porcentaje de anticuerpos en una formulación (por ejemplo, una composición farmacéutica) que se oxidan en un residuo de aminoácido en particular, por ejemplo, un residuo de Trp (por ejemplo, Trp100 en HVR-H3 de hu31A.v11) o un residuo de Met. El porcentaje de oxidación puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de espectrometría de masa (MS) de uno o más péptidos trípticos, donde  
20 residen uno o más residuos de aminoácidos propensos a oxidación en particular. En determinadas modalidades, el porcentaje de oxidación de Trp100 en HVR-H3 de hu31A.v11 se determina a través de la masa de péptidos trípticos oxidados donde reside Trp 100, sobre la masa de péptidos trípticos globales (oxidados y no oxidados), según se determina mediante análisis de MS. El porcentaje de oxidación puede determinarse, por ejemplo, a los 9 meses,  
25 12 meses, 18 meses o dos años a partir de la producción inicial de un anticuerpo o composición farmacéutica de este.

Tal como se usa en la presente, la expresión “se determina tras una prueba de estrés de AAPH” significa que el porcentaje de oxidación en un residuo de aminoácido en particular (por  
30 ejemplo, en Trp100 de HVR-H3 de hu31A.v11) se determina mediante análisis de espectrometría de masa de los péptidos trípticos tras formular el anticuerpo a 150 mg/ml en

AAPH 5 mM durante 25 horas a 40 °C, por ejemplo, tal como se describe en el Ejemplo 5. El anticuerpo estimulado se digiere con tripsina y los péptidos digeridos se someten a cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masa de alta resolución (UHPLC-HRMS) para determinar el porcentaje de oxidación.

5

Tal como se utiliza en la presente, un “amortiguador” hace referencia a una solución amortiguadora que se resiste a cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados a base de ácidos. El amortiguador de la presente invención posee un pH dentro del intervalo de alrededor de 4.5 a alrededor de 8.0 (por ejemplo, alrededor de 4.5, alrededor de 5, alrededor de 5.5, alrededor de 6, alrededor de 6.5, alrededor de 7, alrededor de 7.5 o  
10 alrededor de 8), por ejemplo, alrededor de pH 5.5. Por ejemplo, el acetato de histidina es un ejemplo de amortiguador que contra el pH dentro de este intervalo. Otro amortiguador adecuado es succinato de arginina y/o succinato de histidina.

15 Un “conservante” es un compuesto que puede incluirse opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en esta, lo que facilita la producción de una formulación multiuso, por ejemplo. Los ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena  
20 larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como el alcohol fenílico, butílico y bencílico; parabenos de alquilo tales como parabeno de metilo o propilo; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol. En una modalidad, el conservante de la presente es alcohol bencílico.

25 Tal como se usa en la presente, un “tensioactivo” hace referencia a un agente tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos de la presente incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); TRITON®; dodecilsulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés); laurilsulfato de sodio; octil glucósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-,  
30 , linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-

betaina (por ejemplo, lauroamidopropilo); miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil taurato de sodio o metiloleil taurato de disodio; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etilen y propilenglicol (por ejemplo, copolímeros de bloque de tipo PLURONIC®, por ejemplo, PLURONIC® F-68); y similares. En una modalidad, el tensioactivo de la presente es polisorbato 20. En aun otra modalidad, el tensioactivo de la presente es poloxámero 188.

Un “portador farmacéuticamente aceptable” hace referencia a un ingrediente de una formulación farmacéutica, que no sea un ingrediente activo, que no es tóxico para un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable incluye, de modo no taxativo, un amortiguador, excipiente, estabilizador o conservante.

Tal como se usa en la presente solicitud, el término “profármaco” hace referencia a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco original y que puede activarse o convertirse de forma enzimática en la forma original más activa. Ver, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy” *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615.<sup>a</sup> conferencia en Belfast (1986) y Stella et ál. “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,” *Directed Drug Delivery*, Borchardt et ál. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen  $\beta$ -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre de citotóxicos más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivar en una forma de profármaco para utilizar en la presente invención incluyen, de modo no taxativo, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un “sujeto” es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, de modo no taxativo, animales de granja (tales como vacas y ovejas), animales utilizados en deportes, mascotas (tales como gatos, perros y caballos) primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos (por ejemplo, monos cynomolgus)) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas).

Tal como se usa en la presente, “administrar” significa un método para administrar a un sujeto una dosificación de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa de la invención o un agente terapéutico adicional) o una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo contra triptasa de la invención, e incluye también opcionalmente un agente terapéutico adicional, que puede incluir un excipiente tal como un antioxidante (por ejemplo, N-acetiltryptófano y/o metionina)). Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente pueden administrarse, por ejemplo, por vía intravítrea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, periocular, conjuntival, subtenoniana, intracameral, subretinal, retrobulbar, intracanalicular, mediante inhalación, mediante inyección, mediante implante, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada que afecta las células objetivo de forma directa, mediante catéter, mediante lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente también pueden administrarse de forma sistémica o local. El método de administración puede variar en función de diversos factores (por ejemplo, el compuesto o composición que se administra y la gravedad de la afección, enfermedad o trastorno que se trata).

Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” de un agente, por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa o una formulación farmacéutica (por ejemplo, una formulación farmacéutica que incluye un anticuerpo contra triptasa, que puede incluir un excipiente tal como un antioxidante (por ejemplo, N-acetiltryptófano y/o metionina)), hace referencia a una

cantidad eficaz, a dosificaciones y por períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico o terapéutico deseado. La cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa), o composición de este, puede mejorar o tratar el trastorno o enfermedad, o prevenir, reducir, mejorar o tratar síntomas asociados con el trastorno o enfermedad.

Tal como se usa en la presente, “tratamiento” (y sus variaciones gramaticales como “tratar” o “se trata”) hace referencia a una intervención clínica con el fin de alterar el transcurso natural del individuo que se trata, y se puede llevar a cabo ya sea para la profilaxis o durante el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseados del tratamiento incluyen, de modo no taxativo, evitar la aparición o la recurrencia de una enfermedad, aliviar los síntomas, disminuir cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, evitar la metástasis, disminuir la velocidad de avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión o mejora en el pronóstico. En algunas modalidades, se usan anticuerpos de la invención para retrasar el desarrollo de una enfermedad o para enlentecer la evolución de una enfermedad. Un paciente puede recibir un “tratamiento” exitoso para el asma, por ejemplo, si, luego de recibir una terapia para el asma, el paciente muestra una reducción observable y/o mensurable, o la ausencia de uno o más de los siguientes: sibilancia recurrente, tos, dificultad para respirar, opresión del pecho, síntomas que se producen o empeoran por la noche, síntomas que se activan con aire frío, ejercicio o exposición a alérgenos.

Tal como se usa en la presente, el término “interleucina-5 (IL-5)” hace referencia a cualquier IL-5 natural de cualquier origen vertebrado, incluso mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. El término abarca IL-5 “de longitud completa” no procesada, IL-5 madura, así como cualquier forma de IL-5 que surja de modificaciones postraduccionales. El término abarca también las variantes de IL-5 de origen natural, tales como variantes de corte y empalme o variantes alélicas. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-5 puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB P05113.

La expresión “antagonista de unión a IL-5” hace referencia a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de IL-5 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como el receptor de IL-5, alfa (*IL5RA*). Los ejemplos de antagonistas de unión al eje de IL-5 que pueden utilizarse en los métodos de la invención incluyen, por ejemplo, antagonistas de unión a IL-5 (por ejemplo, anticuerpos contra IL-5 (por ejemplo, mepolizumab, benralizumab y reslizumab) y antagonistas de unión al receptor de IL-5 (por ejemplo, anticuerpos contra IL-5R)).

Tal como se usa en la presente, “interleucina-13 (IL-13)” hace referencia a cualquier IL-13 natural de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. IL-13 es una citocina secretada por muchos tipos de células, incluso linfocitos T auxiliares de tipo 2 (Th2). El término abarca IL-13 “de longitud completa” no procesada, IL-13 madura, así como cualquier forma de IL-13 que surja de modificaciones postraduccionales. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-13 humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB P35225.

La expresión “antagonista de unión al eje de IL-13” hace referencia a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de IL-13 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como el receptor de IL-4 alfa (*IL4Rα*), el receptor de IL-13 alfa 1 (*IL13RA1*) y el receptor de IL-13 alfa 2 (*IL13RA2*). Los antagonistas de unión al eje de IL-13 incluyen antagonistas de unión a IL-13 (por ejemplo, anticuerpos contra IL-13, por ejemplo, lebrikizumab, 228B/C-1, 228A-4, 227-26 y 227-43 (ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 7,674,459, 8,067,199, 8,088,618, 8,318,160 y 8,734,797) y antagonistas de unión al receptor de IL-13 (por ejemplo, un anticuerpo contra *IL4Rα*, anticuerpo contra *IL13RA1* o anticuerpo contra *IL13RA2*).

Tal como se usa en la presente, “interleucina-17 (IL-17)” hace referencia a cualquier IL-17 natural de cualquier fuente vertebrada, que incluye mamíferos como primates (por ejemplo, humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario, e incluye los miembros de la familia IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. El término

abarca IL-17 “de longitud completa” no procesada, IL-17 madura, así como cualquier forma de IL-17 que surja de modificaciones postraduccionales. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17A humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q16552. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17B humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q9UHF5. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17C humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q9P0M4. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17D humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q8TAD2. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17E humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q9H293. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-17F humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q96PD4.

La expresión “antagonista de unión al eje de IL-17” hace referencia a una molécula que disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la transducción de señales que resultan de la interacción de IL-17 con uno o más de sus compañeros de unión, tales como el receptor de interleucina-17 (IL-17R) proteínas de la familia del receptor A de interleucina 17 (IL17RA), receptor B de interleucina 17 (IL17RB), receptor C de interleucina 17 (IL17RC), receptor D de interleucina 17 (IL17RD), receptor E de interleucina 17 (IL17RE) y receptor similar a E de interleucina 17 (IL17REL). Los ejemplos de antagonistas de unión al eje de IL-17 incluyen, por ejemplo, antagonistas de unión a IL-17 (por ejemplo, anticuerpos contra IL-17 (por ejemplo, secukinumab (AIN417), ixekizumab (LY2439821), bimekizumab y NI-1401) y antagonistas de unión al receptor IL-17 (por ejemplo, anticuerpos contra IL-17R (por ejemplo, brodalumab (AMG-827))). Ver, por ejemplo, WO 2006/013107, WO 2007/070750, WO 2012/156219 y la patente estadounidense n.º 8,715,669.

Tal como se usa en la presente, el término “interleucina-33 (IL-33)” hace referencia a cualquier IL-33 natural de cualquier origen vertebrado, incluso mamíferos, tales como primates (por ejemplo, humanos y monos cynomolgus) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. IL-33 también se conoce en la técnica como factor nuclear de vénulas de endotelio alto (NF-HEV; ver, por ejemplo, Baekkevold et ál. *Am. J. Pathol.* 163(1): 69-79, 2003), DVS27, C9orf26, y el miembro familiar 11 de interleucina-1 (IL-1F11). El término

abarca IL-33 “de longitud completa” no procesada, IL-33 madura, así como cualquier forma de IL-33 que surja de modificaciones postraduccionales. La IL-33 no procesada humana de longitud completa contiene 270 aminoácidos (a.a.) y también puede denominarse IL-33<sub>1-270</sub>. Las formas procesadas de IL-33 humana incluyen, por ejemplo, IL-33<sub>95-270</sub>, IL-33<sub>99-270</sub>, IL-33<sub>109-270</sub>, IL-33<sub>112-270</sub>, IL-33<sub>1-178</sub> e IL-33<sub>179-270</sub> (Lefrançois et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(5):1673-1678, 2012 y Martin, *Semin. Immunol.* 25: 449-457, 2013). En algunas modalidades, las formas procesadas de IL-33 humana, por ejemplo, IL-33<sub>95-270</sub>, IL-33<sub>99-270</sub>, IL-33<sub>109-270</sub> u otras formas procesadas por proteasas tales como calpaína, proteinasa 3, elastasa neutrofílica y catepsina G pueden tener una actividad biológica mayor en comparación con IL-33 de longitud completa. El término también abarca variantes de origen natural de IL-33, por ejemplo, variantes de corte y empalme (por ejemplo, la variante de corte y empalme constitucionalmente activa splIL-33 que carece el exón 3, Hong et ál. *J. Biol. Chem.* 286(22):20078-20086, 2011) o variantes alélicas. La IL-33 puede estar presente dentro de una célula (por ejemplo, dentro del núcleo) o como una forma de citocina secretada. La proteína de IL-33 de longitud completa contiene un motivo de unión a ADN de hélice-giro-hélice que incluye una secuencia de localización nuclear (a.a. 1-75 de IL-33 humana), que incluye un motivo de unión a cromatina (a.a. 40-58 de IL-33 humana). Las formas de IL-33 que se procesan y secretan carecen de estos motivos del extremo N. La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de IL-33 humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB O95760.

Las expresiones “interleucina 1 similar al receptor 1 (IL1RL1)” y “ST2”, utilizadas de manera intercambiable en la presente, hacen referencia a cualquier ST2 natural de cualquier origen vertebrado, que incluye mamíferos tales como primates (por ejemplo, seres humanos) y roedores (por ejemplo, ratas y ratones), a menos que se indique lo contrario. En la técnica también se hace referencia a ST2 como DER4, T1 y FIT-1. El término abarca ST2 “de longitud completa” no procesada, ST2 madura, así como cualquier forma de ST2 que surja de modificaciones postraduccionales. Se conocen en la técnica al menos cuatro isoformas ST2, que incluyen soluble (sST2, también conocida como IL1RL1-a) y transmembrana (ST2L, también conocida como IL1RL1-b), que surgen de la expresión de ARNm diferencial de un sistema promotor dual, y ST2V y ST2LV, que surgen del corte y empalme alternativo, tal como

se describe más adelante. La estructura de dominio de ST2L incluye tres dominios C2 extracelulares similares a inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio de receptor de Toll/interleucina-1 citoplasmático (TIR). sST2 no posee los dominios transmembrana y citoplasmático contenido dentro de ST2L e incluye una secuencia única de 9 aminoácidos (a.a.) del extremo C (ver, por ejemplo, Kakkar et ál. *Nat. Rev. Drug.* 7: 827-840, 2008). sST2 puede funcionar como un receptor señuelo para inhibir la IL-33 soluble. La expresión también abarca las variantes de origen natural de ST2, por ejemplo, variantes de corte y empalme (por ejemplo, ST2V, que no posee el tercer motivo de inmunoglobulina y posee una cola hidrofóbica única, y ST2LV, que no posee el dominio transmembrana de ST2L) o variantes alélicas (por ejemplo, variantes que protegen contra el riesgo de asma o que confieren el riesgo de asma tal como se describe en la presente). La secuencia de aminoácidos de un ejemplo de ST2 humana puede hallarse, por ejemplo, con el número de acceso de UniProtKB Q01638. ST2 es una parte del receptor de IL-33 junto con la proteína correceptora de IL-1RAcP. La unión de IL-33 a ST2 y la proteína accesoria del receptor de interleucina-1 (IL-1RAcP) forma un complejo de señalización ternario 1:1:1 para promover la transducción de señal posterior (ver, por ejemplo, Lingel et ál. *Structure* 17(10): 1398-1410, 2009 y Liu et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110(37): 14918-14924, 2013).

Por “eje de IL-33” se entiende un ácido nucleico (por ejemplo, un gen o ARNm transcrito a partir del gen) o polipéptido que se ve implicado en la transducción de señal de IL-33. Por ejemplo, el eje de IL-33 puede incluir el ligando de IL-33, un receptor (por ejemplo, ST2 y/o IL-1RAcP), moléculas adaptoras (por ejemplo, MyD88) o proteínas que se asocian con moléculas receptoras y/o moléculas adaptoras (por ejemplo, cinasas, tales como cinasa 1 asociada con el receptor de interleucina-1 (IRAK1) y cinasa 4 asociada con el receptor de interleucina-1 (IRAK4) o ligasas de ubiquitina E3, tales como el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6)).

Un “antagonista de unión al eje de IL-33” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de un compañero de unión del eje de IL-33 con uno o más de sus compañeros de unión. Tal como se usa en la presente, un antagonista de unión al eje IL-33 incluye antagonistas de unión a IL-33, antagonistas de unión a ST2 y antagonistas de unión a

IL1RAcP. Los ejemplos de antagonistas de unión al eje de IL-33 incluyen anticuerpos contra IL-33 y fragmentos de unión al antígeno de estos (por ejemplo, anticuerpos contra IL-33 tales como ANB-020 (AnaptysBio, Inc.) o cualquiera de los anticuerpos descritos en EP1725261, US8187596, WO2011031600, WO2014164959, WO2015099175 o WO2015106080, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad); polipéptidos que se unen a IL-33 y/o a su receptor (ST2 y/o IL-1RAcP) y bloquean la interacción de ligando-receptor (por ejemplo, proteínas ST2-Fc, tales como las descritas en WO 2014/152195, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad; inmunoadhesinas, peptidocuerpos y ST2 soluble, o derivados de estos); anticuerpos contra el receptor de IL-33 (por ejemplo, anticuerpos contra ST2, por ejemplo, AMG-282 (Amgen) o STLM15 (Janssen), o cualquiera de los anticuerpos contra ST2 descritos en WO 2013/173761 y WO 2013/165894, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad; o proteínas ST2-Fc, tales como las descritas en WO 2013/173761, WO 2013/165894 o WO 2014/152195, que se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad); y antagonistas del receptor de IL-33, tales como inhibidores de molécula pequeña, aptámeros que se unen a IL-33 y ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones rigurosas a secuencias de ácido nucleico del eje de IL-33 (por ejemplo, ARN interferentes pequeños (ARNip) o ARN de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas (CRISPR-ARN o ARNcr), incluso ARN guías simples (ARNgs) con una secuencia de ARNcr y ARNtracr descrita en Mali et ál. (*Science*. 339: 823-26, 2013), que se incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia).

Las expresiones “anticuerpo contra IL-33”, “anticuerpo que se une a IL-33” y “anticuerpo que se une específicamente a IL-33” hacen referencia a un anticuerpo que puede unirse a IL-33 con suficiente afinidad, de forma tal que el anticuerpo sea útil como agente terapéutico y/o de diagnóstico al dirigirse a la IL-33. En una modalidad, el grado de la unión de un anticuerpo contra IL-33 a una proteína que no sea IL-33 no relacionada es menor que alrededor de 10 % de la unión del anticuerpo a IL-33 tal como se mide, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA). En determinadas modalidades, un anticuerpo que se une a IL-33 tiene una constante de disociación ( $K_D$ )  $\geq 1 \mu\text{M}$ ,  $\geq 100 \text{ nM}$ ,  $\geq 10 \text{ nM}$ ,  $\geq 1 \text{ nM}$ ,  $\geq 0.1 \text{ nM}$ ,  $\geq 0.01 \text{ nM}$  o  $\geq 0.001 \text{ nM}$  (por ejemplo,  $10^{-8} \text{ M}$  o menor, por ejemplo, de  $10^{-8} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$ , por ejemplo,

de  $10^{-9}$  M a  $10^{-13}$  M). En determinadas modalidades, un anticuerpo contra IL-33 se une a un epítipo de IL-33 que se conserva entre IL-33 de diferentes especies.

La expresión “antagonista de unión a ST2” hace referencia a una molécula que inhibe la interacción de una ST2 con IL-33, IL1RAcP y/o una segunda molécula de ST2. El antagonista de unión a ST2 puede ser una proteína, tal como una “proteína de ST2-Fc” que incluye un dominio de unión a IL-33 (por ejemplo, la totalidad o una parte de una proteína de ST2 o IL1RAcP) y un dominio multimerizante (por ejemplo, una parte Fc de una inmunoglobulina, por ejemplo, un dominio Fc de una IgG que se selecciona de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como cualquier alotipo dentro de cada grupo de isotipo), que se acoplan entre sí ya sea de forma directa o indirecta a través de un enlazador (por ejemplo, un enlazador de serina-glicina (SG), enlazador de glicina-glicina (GG) o variante de este (por ejemplo, un enlazador de SGG, GGS, SGS o GSG)), e incluye, de modo no taxativo, proteínas ST2-Fc y variantes de estas descritas en WO 2013/173761, WO 2013/165894 y WO 2014/152195, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En algunas modalidades, un antagonista de unión a ST2 puede ser un anticuerpo contra ST2, por ejemplo, AMG-282 (Amgen) o STLM15 (Janssen), o cualquiera de los anticuerpos contra ST2 descritos en WO 2013/173761 y WO 2013/165894.

Un “ácido nucleico aislado” hace referencia a una molécula de ácido nucleico que se separó de un componente de su entorno natural. Un ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en las células que comúnmente contienen la molécula de ácido nucleico, pero la molécula de ácido nucleico está presente de forma extracromosómica o en una ubicación cromosómica que difiere de su ubicación cromosómica natural.

25

La expresión “secuencias de control” hace referencia a secuencias de ADN necesarias para expresar una secuencia codificante enlazada de forma operativa en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

30

Los términos “célula hospedadora”, “línea de células hospedadoras” y “cultivo de células hospedadoras” se usan de manera intercambiable y se refieren a células en las que se ha introducido ácido nucleico exógeno, que incluye la progenie de dichas células. Las células  
5 hospedadoras incluyen “transformantes” y “células transformadas”, que incluyen la célula primaria transformada y progenie derivada de esta sin importar la cantidad de pasajes. Es posible que la progenie no sea completamente idéntica en contenido de ácido nucleico a una célula progenitora, pero puede contener mutaciones. En la presente se incluye una progenie mutante con la misma función o actividad biológica que se analizó o se seleccionó en la célula  
10 originalmente transformada.

El ácido nucleico está “unido de manera operativa” cuando está en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia previa o un líder secretor está unido de manera operativa al ADN de un polipéptido si se expresa como una  
15 proteína previa que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido de manera operativa a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un punto de unión al ribosoma está unido de manera operativa a una secuencia codificante si se coloca de modo que facilite la traducción. En general, “unido de manera operativa” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso  
20 de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se puede lograr mediante ligación en sitios de restricción convenientes. En caso de que no existan estos sitios, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

25 “Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos”, con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en la presente, se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos de la secuencia con la que se compara, luego de alinear las secuencias e introducir espacios, de ser necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar  
30 ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación a efectos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse

de varias maneras conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de software informático disponible al público, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros adecuados para medir la alineación que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. No obstante, a los efectos de la presente, los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el uso del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C., 20559, donde se encuentra registrado con el n.º de registro de derechos de autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 se encuentra disponible para el público mediante Genentech, Inc., San Francisco sur, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se usa ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada a, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos para, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como se indica a continuación:

100 veces la fracción  $X/Y$

25

donde X es la cantidad de residuos de aminoácido con un puntaje de coincidencia de identidad mediante el programa de alineación de secuencia ALIGN-2 en la alineación de A y B de ese programa, donde Y es la cantidad total de residuos de aminoácido en B. Cabe destacar que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. A menos que se

30

indique lo contrario de forma específica, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en la presente se obtienen tal como se describió en el párrafo inmediatamente anterior mediante el uso del programa informático ALIGN-2.

- 5 Las secuencias de aminoácidos descritas en la presente son secuencias de aminoácidos contiguas, a menos que se exprese lo contrario.

Tal como se utiliza en la presente, se pretende que el término “vector” haga referencia a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al cual se enlazó. Un tipo de vector es un “plásmido”, que hace referencia a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fagos. Otro tipo de vector es un vector viral, donde se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora luego de la introducción en la célula hospedadora y, de esa forma, se replican junto con el genoma hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales se encuentran unidos de manera operativa. En la presente, se hace referencia a dichos vectores como “vectores de expresión recombinante” (o simplemente “vectores recombinantes” o “vector de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante suelen encontrarse en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden utilizarse de manera intercambiable.

25

## II. Composiciones y métodos

En un aspecto, la invención se basa, en parte, en anticuerpos novedosos que se unen a triptasa. En otro aspecto, la invención se basa, parcialmente, en el descubrimiento de que residuos particulares (por ejemplo, residuos de HVR, tales como HVR-H3 W100, que hace referencia a W100 del dominio VH del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11) de los

30

anticuerpos contra triptasa que pueden ser susceptibles a oxidación. La invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen antioxidantes (por ejemplo, N-acetiltriptófano y/o metionina) para reducir o prevenir la oxidación de anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa). Otros excipientes antioxidantes adecuados incluyen, de modo no taxativo, triptófano libre, ciclodextrinas, Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), piridoxina, polioles (por ejemplo, manitol) y quelantes metálicos (por ejemplo, EDTA). Ver, por ejemplo, Ji et ál., *Biotechnology* 98:4485-4500, 2009. Los anticuerpos y composiciones farmacéuticas de la invención son útiles, por ejemplo, para el diagnóstico y/o para el tratamiento de trastornos (por ejemplo, un trastorno pulmonar, un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico, un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios, o un trastorno asociado con triptasa o un trastorno mediado por triptasa). En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas liofilizadas para reducir o eliminar la oxidación de anticuerpos descritos en la presente (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa).

#### *A. Ejemplos de anticuerpos contra triptasa*

La invención proporciona anticuerpos aislados que se unen a la triptasa. En determinadas modalidades, un anticuerpo contra triptasa de la invención se une a triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 100 nM o menor (por ejemplo, 100 nM o menor, 10 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de 10 nM o menor (por ejemplo, 10 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de 1 nM o menor (por ejemplo, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de 0.5 nM o menor (por ejemplo, 0.5 nm o menor, 400 pM o menor, 300 pM o menor, 200 pM o menor, 100 pM o menor, 50 pM o menor, 25 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor, o 0.1 pM o menor). En

algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.1 nM a  
 alrededor de 0.5 nM (por ejemplo, alrededor de 0.1 nM, alrededor de 0.2 nM, alrededor de 0.3  
 nM, alrededor de 0.4 nM o alrededor de 0.5 nM). En algunas modalidades, el anticuerpo se  
 une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 1 pM a alrededor de 500 pM, de alrededor de 1  
 5 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 1 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 1  
 pM a alrededor de 200 pM, de alrededor de 1 pM a alrededor de 100 pM, de alrededor de 1  
 pM a alrededor de 50 pM, de alrededor de 25 pM a alrededor de 500 pM, de alrededor de 25  
 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 25 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 25  
 pM a alrededor de 100 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 500 pM, de alrededor de 50  
 10 pM a alrededor de 450 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 425 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 375 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 350 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 325 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 275 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 250 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 200 pM, de alrededor de 50  
 15 pM a alrededor de 180 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 175 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 150 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 125 pM, de alrededor de 50  
 pM a alrededor de 100 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 75 pM, de alrededor de 100  
 pM a alrededor de 500 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 475 pM, de alrededor de  
 100 pM a alrededor de 450 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 425 pM, de alrededor  
 20 de 100 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 375 pM, de  
 alrededor de 100 pM a alrededor de 350 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 325 pM,  
 de alrededor de 100 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 275  
 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 250 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de  
 225 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 200 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor  
 25 de 180 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 175 pM, de alrededor de 100 pM a  
 alrededor de 150 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 125 pM, de alrededor de 150 pM  
 a alrededor de 500 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 475 pM, de alrededor de 150  
 pM a alrededor de 450 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 425 pM, de alrededor de  
 150 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 375 pM, de alrededor  
 30 de 150 pM a alrededor de 350 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 325 pM, de  
 alrededor de 150 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 375 pM,

de alrededor de 150 pM a alrededor de 350 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 325 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 300 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 275 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 225 pM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 200 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 500 pM, de alrededor de 175 pM a  
5 alrededor de 475 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 450 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 425 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 400 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 375 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 350 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 325 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 300 pM o de alrededor de 180 pM a alrededor de 400 pM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa  
10 con una  $K_D$  de alrededor de 0.4 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.2 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa con una  $K_D$  de alrededor de 0.18 nM. En algunas modalidades, la triptasa es triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta (por ejemplo, triptasa humana beta 1, triptasa humana beta 2 y/o triptasa humana beta 3). En algunas modalidades, la  $K_D$  se  
15 determina en un ensayo de SPR BIACORE®. En determinadas modalidades, la triptasa es triptasa humana alfa. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

En otro ejemplo, en algunas modalidades, un anticuerpo contra triptasa de la invención (que  
20 incluye cualquiera de los anticuerpos contra triptasa que anteceden) puede inhibir una actividad de la triptasa. En algunas modalidades, un anticuerpo contra triptasa de la invención puede inhibir una actividad proteolítica de la triptasa, por ejemplo, según se determina en un ensayo enzimático de triptasa in vitro. En algunas modalidades, puede utilizarse un sustrato artificial, por ejemplo, el péptido sintético S-2288, como sustrato en un ensayo enzimático de  
25 triptasa in vitro. En algunas modalidades, un anticuerpo contra triptasa de la invención puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una concentración inhibitoria máxima media ( $IC_{50}$ ) de alrededor de 100 nM o menor (por ejemplo, 100 nM o menor, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2.5 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor, o 0.1 pM o menor) según se determina con un ensayo enzimático de triptasa in vitro, por  
30 ejemplo, mediante el uso de S-2288 como sustrato. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una  $IC_{50}$  de alrededor de 10 nM o menor

(por ejemplo, 10 nM o menor, 5 nM o menor, 2.5 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor, o 0.1 pM o menor) según se determina con un ensayo enzimático de triptasa in vitro, por ejemplo, mediante el uso de S-2288 como sustrato. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una

5 IC50 de alrededor de 2.5 nM o menor (por ejemplo, 2.5 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor, o 0.1 pM o menor) según se determina con un ensayo enzimático de triptasa in vitro, por ejemplo, mediante el uso de S-2288 como sustrato. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una

10 IC50 de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 2 nM (por ejemplo, alrededor de 0.1 nM, alrededor de 0.2 nM, alrededor de 0.3 nM, alrededor de 0.4 nM, alrededor de 0.5 nM, alrededor de 0.6 nM, alrededor de 0.7 nM, alrededor de 0.8 nM, alrededor de 0.9 nM, alrededor de 1.0 nM, alrededor de 1.1 nM, alrededor de 1.2 nM, alrededor de 1.3 nM, alrededor de 1.4 nM, alrededor de 1.5 nM, alrededor de 1.6 nM, alrededor de 1.7 nM, alrededor de 1.8 nM, alrededor de 1.9 nM o alrededor de 2.0 nM). En algunas modalidades, el

15 anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC50 de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 2.5 nM (por ejemplo, alrededor de 0.5 nM, alrededor de 0.6 nM, alrededor de 0.7 nM, alrededor de 0.8 nM, alrededor de 0.9 nM, alrededor de 1.0 nM, alrededor de 1.1 nM, alrededor de 1.2 nM, alrededor de 1.3 nM, alrededor de 1.4 nM, alrededor de 1.5 nM, alrededor de 1.6 nM, alrededor de 1.7 nM, alrededor de 1.8 nM, alrededor de 1.9 nM,

20 alrededor de 2.0 nM, alrededor de 2.1 nM, alrededor de 2.2 nM, alrededor de 2.3 nM, alrededor de 2.4 nM o alrededor de 2.5 nM). En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC50 de alrededor de 1 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 25 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 75 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 100 pM a alrededor de

25 2.5 nM, de alrededor de 125 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 200 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 225 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 250 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 300 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 325 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 350 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 375 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de

30 de 400 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 425 pM a alrededor de 2.5 nM, de

alrededor de 450 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 450 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 550 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 600 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 650 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 700 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 750 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 800 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 850 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 900 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 950 pM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.1 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.2 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.3 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.4 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.5 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.6 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.7 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.8 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 1.9 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 2.0 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 2.1 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 2.2 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 2.3 nM a alrededor de 2.5 nM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 1.9 pM, de alrededor de 750 pM a alrededor de 1.9 pM, de alrededor de 1 nM a alrededor de 1.9 pM, de alrededor de 1.25 nM a alrededor de 1.9 pM, de alrededor de 1.5 nM a alrededor de 1.9 pM, de alrededor de 1 nM a alrededor de 1.85 nM, de alrededor de 1.25 nM a alrededor de 1.85 nM, de alrededor de 1.25 nM a alrededor de 1.85 nM, de alrededor de 1.5 nM a alrededor de 1.85 nM, de alrededor de 1 nM a alrededor de 1.8 nM, de alrededor de 1.25 nM a alrededor de 1.8 nM, de alrededor de 1.5 nM a alrededor de 1.8 nM o de alrededor de 1.6 nM a alrededor de 1.8 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC<sub>50</sub> de alrededor de 1.8 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC<sub>50</sub> de alrededor de 0.5 nM a alrededor de 1 nM (por ejemplo, alrededor de 0.5 nM, alrededor de 0.6 nM, alrededor de 0.7 nM, alrededor de 0.8 nM, alrededor de 0.9 nM o alrededor de 1.0 nM). En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC<sub>50</sub> de alrededor de 1 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 25 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 50 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 75 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 100 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 125 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 150 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 200 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 225 pM a alrededor de 1 nM, de

alrededor de 250 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 300 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 325 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 350 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 375 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 400 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 425 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 450 pM a alrededor de 1 nM, de  
5 alrededor de 500 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 450 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 500 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 550 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 600 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 650 pM a alrededor de 1 nM, de  
alrededor de 700 pM a alrededor de 1 nM, de alrededor de 750 pM, de alrededor de 250 pM a  
alrededor de 800 pM, de alrededor de 300 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 325 pM  
10 a alrededor de 800 pM, de alrededor de 325 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 350  
pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 375 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de  
400 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 425 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor  
de 450 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 800 pM, de  
alrededor de 450 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 800 pM,  
15 de alrededor de 550 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 600 pM a alrededor de 800  
pM, de alrededor de 650 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 700 pM a alrededor de  
800 pM, de alrededor de 750 pM a alrededor de 800 pM, de alrededor de 1 pM a alrededor de  
600 pM, de alrededor de 25 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 50 pM a alrededor de  
600 pM, de alrededor de 75 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 100 pM a alrededor  
20 de 600 pM, de alrededor de 125 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 150 pM a  
alrededor de 600 pM, de alrededor de 175 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 200 pM  
a alrededor de 600 pM, de alrededor de 225 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 250  
pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 300 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de  
325 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 325 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor  
25 de 350 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 375 pM a alrededor de 600 pM, de  
alrededor de 400 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 425 pM a alrededor de 600 pM,  
de alrededor de 450 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 500 pM a alrededor de 600  
pM, de alrededor de 450 pM a alrededor de 600 pM, de alrededor de 500 pM a alrededor de  
600 pM o de alrededor de 550 pM a alrededor de 600 pM. En algunas modalidades, el  
30 anticuerpo es capaz de inhibir la actividad de la triptasa humana con una IC<sub>50</sub> de alrededor de  
0.6 nM. En algunas modalidades, la triptasa es triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana

beta (por ejemplo, triptasa humana beta 1, triptasa humana beta 2 y/o triptasa humana beta 3). En algunas instancias, la actividad de inhibición del anticuerpo se determina tal como se describe en la presente, por ejemplo, en los Ejemplos (por ejemplo, particularmente el apartado (A)(viii)(a) del Ejemplo 1) o mediante otros abordajes conocidos en la técnica. En determinadas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado. En algunas modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana como anticuerpo monovalente o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de este (por ejemplo, un Fab). En otras modalidades, el anticuerpo puede inhibir la actividad de la triptasa humana como anticuerpo bivalente (por ejemplo, un anticuerpo IgG (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 o IgG4) o un F(ab')<sub>2</sub>).

En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos en la presente puede inhibir la contracción estimulada por triptasa de las células de músculo liso de las vías aéreas primarias humanas. En otras instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos en la presente puede inhibir la contracción estimulada por triptasa de las células de músculo liso de las vías aéreas primarias humanas. En aun otras instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos en la presente puede inhibir la liberación de histamina y/o desgranulación de mastocitos estimulada por IgE o triptasa. En casos adicionales, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos en la presente puede reducir la cantidad de triptasa activa (por ejemplo, en una muestra tal como líquido de lavado broncoalveolar o una muestra nasal), por ejemplo, luego de la administración a un sujeto. Por ejemplo, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos en la presente puede reducir la cantidad de triptasa activa alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 30 %, alrededor de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más. La reducción puede ser con respecto a una cantidad de referencia de triptasa activa, por ejemplo, la cantidad de triptasa activa en una muestra antes de la administración del anticuerpo contra triptasa.

30

En algunos casos, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) puede incluir al

menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2GMX_3$  (SEQ ID NO: 1), donde  $X_1$  es Asp o Ser,  $X_2$  es Tyr o Phe, y  $X_3$  es Val o His; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (a) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos  $RX_1X_2X_3DWYFDV$  (SEQ ID NO: 3), donde  $X_1$  es Asn o Asp,  $X_2$  es Tyr o Asn, y  $X_3$  es Asp o Tyr; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6.

Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra tripsina) puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o 4-8.

En un ejemplo en particular, en algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra tripsina) puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos

FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 11); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGGLEWVA (SEQ ID NO: 12); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR (SEQ ID NO: 13); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 14). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 15); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKSPKWIY (SEQ ID NO: 16); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 17); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 18). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10, tal como el anticuerpo

hu31A.v11.

En otro ejemplo en particular, en algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RDNYDWYFDV (SEQ ID NO: 29); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS (SEQ ID NO: 21); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGGLEWVA (SEQ ID NO: 22); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RFTISRDNPKNLTLFLQMSSLRSEDAMYYCAR (SEQ ID NO: 23); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 24). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC (SEQ ID NO: 25); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGSSPKPWIY (SEQ ID NO: 26); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos

GVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYC (SEQ ID NO: 27); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 28). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 y un dominio VL que  
 5 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, tal como el anticuerpo 31a.

En algunas instancias, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de  
 10 secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 9, 101, 102, 103 y 104; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos  
 15 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 105 y 106; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102. En otros  
 20 casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 98 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio  
 25 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En otros  
 30 casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 99 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 y un dominio VL que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 100 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 102. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10. En otros casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103.

20

En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende His51 y al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84,

30

- Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once o los doce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar tanto la interfaz pequeña de la triptasa humana beta 1 tetramérica como la interfaz grande de la triptasa humana beta 1 tetramérica.
- En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa que anteceden incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Val30; Thr31; Tyr32; Tyr34; Arg50; Tyr90; His92; Ser93; y Tyr94, y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Phe50; Ser52; Gly53; Ser54; Ser55; Thr56; Tyr58; Arg95; Tyr97; y Asp98.

- Por ejemplo, en algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93 y Tyr94, o los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56, Tyr58, Arg95, Tyr97 y Asp98. En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93 y Tyr94, y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56,

Tyr58, Arg95, Tyr97 y Asp98.

En algunos casos, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 30-35.

En algunas instancias, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51 y 52; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 53, 58 o 59; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al

menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos WX<sub>1</sub>RQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 39); donde X<sub>1</sub> es Ile o Val; (c) una FR-H3 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos RX<sub>1</sub>TISX<sub>2</sub>DTSKNQX<sub>3</sub>SLKLSSVTAADTAVYX<sub>4</sub>CAR (SEQ ID NO: 40); donde X<sub>1</sub> es Val o Ser, X<sub>2</sub> es Arg o Val, X<sub>3</sub> es Val o Phe y X<sub>4</sub> es Tyr o Phe; y (d) una FR-H4 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

15

Por ejemplo, en algunos casos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

20

Como otro ejemplo, en algunos casos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGLSLRSCAVSRFSLI (SEQ ID NO: 44); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 45); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 46); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos

30

WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

Como otro ejemplo, en algunos casos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI (SEQ ID NO: 44); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQAPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 45); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR (SEQ ID NO: 46); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 41).

En algunos casos, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos DX<sub>1</sub>QX<sub>2</sub>TQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 60), donde X<sub>1</sub> es Ile o Ala, y X<sub>2</sub> es Met o Leu; (b) una FR-L2 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKX<sub>1</sub>PKLLIY (SEQ ID NO: 61); donde X<sub>1</sub> es Ala o Pro; (c) una FR-L3 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos VPSRFSGSGSX<sub>1</sub>TDFTLTISLQPEDFATYX<sub>2</sub>C (SEQ ID NO: 62), donde X<sub>1</sub> es Gly o Glu, y X<sub>2</sub> es Tyr o Phe; y (d) una FR-L4 que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63).

30

Por ejemplo, en casos en particular, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por

ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC (SEQ ID NO: 64), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGKVEIK (SEQ ID NO: 63).

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos que anteceden (por ejemplo, anticuerpos contra triptasa) puede incluir una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos AAVLTQTPASVSAVGGTVSISC (SEQ ID NO: 67); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 68); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFKSGSGSETQFTLTISDVQX<sub>1</sub>DDAATYFC (SEQ ID NO: 69), donde X<sub>1</sub> es Cys o Ala; y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGKVEIK FGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 70).

En algunas instancias, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 47, 48, 49, 50, 51 y 52; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37, 53, 58 y 59; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Por ejemplo, en algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 y un dominio VL que comprende la secuencia de

[illegible]

anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 50 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59. En algunos casos, el anticuerpo comprende un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59.

En otro ejemplo en particular, en algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30);

(b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos EVQLVESGPGGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 38); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO: 42); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 43); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 41). En algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena pesada: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC (SEQ ID NO: 64), (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 65); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 66); y (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa incluye un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37, tal como el anticuerpo contra triptasa huE104.v2.

En otro ejemplo en particular, en algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) puede incluir (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos GYAIT (SEQ ID NO: 30); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos GISSAATTFYSSWAKS (SEQ ID NO: 31); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DPRGYGAALDRLDL (SEQ ID NO: 32); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos QSIKSVYNNRLG (SEQ ID NO: 33); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos ETSILTS (SEQ ID NO: 34); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos AGGFDRSGDTT (SEQ ID NO: 35). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye (a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52; (b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos alrededor de 90 % (por ejemplo, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes regiones marco (FR) de cadena pesada: (a) una FR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos QXSLEESGGGLFKPTDTLTLTCTVSRFSLI (SEQ ID NO: 54); (b) una FR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos WVRQSPENGLEWIG (SEQ ID NO: 55); (c) una FR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR (SEQ ID NO: 56); y (d) una FR-H4 que comprende la secuencia de aminoácidos WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye una, dos, tres o cuatro de las siguientes FR de cadena ligera: (a) una FR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC (SEQ ID NO: 67); (b) una FR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO: 68); (c) una FR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos GVPSRFKGSGETQFTLTISDVQX<sub>1</sub>DDAATYFC (SEQ ID NO: 69), donde X<sub>1</sub> es Cys o Ala; y

- (d) una FR-L4 que comprende la secuencia de aminoácidos FGQGTKVEIKFGGGTEVVVK (SEQ ID NO: 70). En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 53, tal como el anticuerpo E104. En algunas modalidades, el anticuerpo (por ejemplo, el anticuerpo contra triptasa) incluye un dominio VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y un dominio VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59.
- 10 En algunas instancias, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y/o (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una
- 15 identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En algunas instancias, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 76 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 77. En algunas
- 20 modalidades, la cadena pesada comprende además un residuo de lisina (K) en el extremo C.

- En algunas instancias, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y/o (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una
- 25 identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. En algunas instancias, el anticuerpo comprende una
- 30 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 78 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 79. En algunas

modalidades, la cadena pesada comprende además un residuo de lisina (K) en el extremo C.

En algunas instancias, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y/o (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En algunas instancias, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 81. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende además un residuo de lisina (K) en el extremo C.

En algunas instancias, la invención proporciona un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y/o (b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 90 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83. En algunas instancias, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 83. En algunas modalidades, la cadena pesada comprende además un residuo de lisina (K) en el extremo C.

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa humana beta 1 que comprende al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln100, Leu101 y Leu102 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82,

Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o los catorce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo comprende Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona a un monómero o tetrámero de la triptasa humana beta 1. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un tetrámero de la triptasa humana beta 1, y el epítipo de la triptasa humana beta 1 comprende además uno o ambos de Gln35 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la interfaz pequeña y/o la interfaz grande de la triptasa humana beta 1.

En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa que anteceden incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 19 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr29; Asn30; Arg32; y Arg94, y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Gly31; Tyr32; Ser52; Ser53; Ala54; Thr56; Phe58; Pro96; Arg97; Gly98; Tyr99; y Arg100e.

25

Por ejemplo, en algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr29, Asn30, Arg32 y Arg94, o los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Gly31, Tyr32, Ser52, Ser53, Ala54, Thr56, Phe58, Pro96, Arg97, Gly98, Tyr99 y Arg100e. En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa incluye un parátipo que se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que

30

incluye los residuos de aminoácidos de región variable de cadena ligera Tyr29, Asn30, Arg32 y Arg94, y los residuos de aminoácidos de región variable de cadena pesada Gly31, Tyr32, Ser52, Ser53, Ala54, Thr56, Phe58, Pro96, Arg97, Gly98, Tyr99 y Arg100e.

- 5 En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa que anteceden se une a triptasa humana. En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a la triptasa de mono cynomolgus (cyno). En algunas instancias, el anticuerpo se une a la triptasa humana alfa o a la triptasa humana beta. En algunas instancias, el anticuerpo se une a la triptasa humana beta 1, triptasa humana beta 2 o triptasa humana beta 3.

10

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos contra triptasa que se unen a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84 y Ala85, que pueden

- 15 referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. Por ejemplo, en algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres o los cuatro residuos que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71 o un
- 20 aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a un epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que comprende His51 y al menos uno, al menos dos o los tres residuos que se seleccionan del grupo que consiste en Val80, Lys81 y Asp82 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo de
- 25 triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos
- 30 nueve, al menos diez, al menos once o los doce residuos de aminoácidos que se seleccionan

del grupo que consiste en Gln67, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un monómero o tetrámero de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1). En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo puede disociar tanto la interfaz pequeña de la triptasa tetramérica como la interfaz grande de la triptasa tetramérica (por ejemplo, triptasa humana beta 1).

En aun otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos contra triptasa que se unen a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105 y Arg106, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende además uno o más residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece o los catorce residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128 y Glu129 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo comprende Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de

- cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un monómero o tetrámero de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1). En algunas modalidades, el epítipo se relaciona con un tetrámero, y el epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) comprende además uno o ambos de Gln35 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el epítipo se determina mediante un modelo de cristalografía de rayos X. En algunas modalidades, el anticuerpo es capaz de disociar la interfaz pequeña y/o la interfaz grande de triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1).
- 5 En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 residuos de aminoácidos) que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128 y Glu129, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.
- 15

- Por ejemplo, en algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Gln67 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Asp82 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Leu83 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Ala84 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Arg87 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Pro103 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En
- 20
- 25
- 30

algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que comprende Val104 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Ser105 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Arg106 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Glu128 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Glu129 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, o los once residuos de aminoácidos que se seleccionan del grupo que consiste en Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128 y Glu129, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.

En algunas instancias, cualquiera de los anticuerpos que anteceden se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además uno o más residuos de aminoácidos adicionales (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 residuos de aminoácidos adicionales) que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81, Ala85 y Pro130, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. Por ejemplo, en algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además His51 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa

(por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Val80 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas modalidades, el anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Lys81 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Ala85 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Pro130 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.

En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además dos o más, tres o más, cuatro o más, o cinco o más residuos de aminoácidos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en His51, Val80, Lys81, Ala85 y Pro130, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.

En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71, que puede referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que consiste en His51, Gln67, Val80, Lys81, Asp82, Leu83, Ala84, Ala85, Arg87, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu128, Glu129 y Pro130 de la SEQ ID NO: 71.

En otras instancias, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa que anteceden se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) residuos de aminoácidos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en Gln35, Trp55, Gln100, Leu101, Leu102, Glu126, Leu127 y Arg216, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido

correspondiente de cualquier proteína de triptasa. Por ejemplo, en algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Gln35 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Trp55 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Gln100 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Leu101 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Leu102 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Glu126 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Leu127 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además Arg216 de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye además dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, u ocho o más residuos de aminoácidos adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en Gln35, Trp55, Gln100, Leu101, Leu102, Glu126, Leu127 y Arg216, que pueden referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa.

En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que incluye Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128,

Glu129 y Arg216, que puede referirse a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71 o un aminoácido correspondiente de cualquier proteína de triptasa. En algunas instancias, el anticuerpo contra triptasa se une a un epítipo de la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) que consiste en Gln35, Trp55, Gln67, Asp82, Leu83, Ala84, Arg87, Gln100, Leu101, Leu102, Pro103, Val104, Ser105, Arg106, Glu126, Leu127, Glu128, Glu129 y Arg216 de la SEQ ID NO: 71.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que compite por la unión a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana beta 1) con cualquiera de los anticuerpos que anteceden.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos que anteceden o a un epítipo superpuesto.

En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos que anteceden puede tener la capacidad de alterar la triptasa con una estructura tetramérica (tal como la triptasa madura presente en los gránulos secretores de los mastocitos o liberada de estos) para formar especies de peso molecular menor, por ejemplo, monómeros, dímeros y/o trímeros.

En un aspecto adicional, un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden puede incorporar cualquiera de las características, de forma individual o combinada, descritas en los apartados 1-7 que figuran a continuación.

### *1. Afinidad de anticuerpos*

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente posee una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $\geq 1 \mu\text{M}$ ,  $\geq 100 \text{ nM}$ ,  $\geq 10 \text{ nM}$ ,  $\geq 1 \text{ nM}$ ,  $\geq 0.1 \text{ nM}$ ,  $\geq 0.01 \text{ nM}$ ,  $\geq 1 \text{ pM}$  o  $\geq 0.1 \text{ pM}$  (por ejemplo,  $10^{-6} \text{ M}$  o menor, por ejemplo, de  $10^{-6} \text{ M}$  a  $10^{-9} \text{ M}$  o menor, por ejemplo, de  $10^{-9} \text{ M}$  a  $10^{-13} \text{ M}$  o menor). En algunas modalidades, un anticuerpo contra triptasa de la invención se une a triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de alrededor de  $100 \text{ nM}$  o menor (por ejemplo,  $100 \text{ nM}$  o menor,  $10 \text{ nM}$  o menor,  $1 \text{ nM}$  o menor,  $100 \text{ pM}$  o menor,  $10 \text{ pM}$  o menor,  $1 \text{ pM}$  o menor o  $0.1 \text{ pM}$  o menor). En

algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de 10 nM o menor (por ejemplo, 10 nM o menor, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de 1 nM o menor (por ejemplo, 1 nM o menor, 100 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa descritos anteriormente o en la presente se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de alrededor de 0.5 nM o menor (por ejemplo, 0.5 nM o menor, 400 pM o menor, 300 pM o menor, 200 pM o menor, 100 pM o menor, 50 pM o menor, 25 pM o menor, 10 pM o menor, 1 pM o menor, o 0.1 pM o menor). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de alrededor de 0.1 nM a alrededor de 0.5 nM (por ejemplo, alrededor de 0.1 nM, alrededor de 0.2 nM, alrededor de 0.3 nM, alrededor de 0.4 nM o alrededor de 0.5 nM). En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de alrededor de 0.4 nM. En algunas modalidades, el anticuerpo se une a la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) con una  $K_D$  de alrededor de 0.18 nM.

En una modalidad, la  $K_D$  se mide a través de un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA). En una modalidad, se realiza un RIA con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno. Por ejemplo, la afinidad de unión de una solución de Fab con un antígeno se mide al equilibrar Fab con una concentración mínima de un antígeno marcado con ( $^{125}\text{I}$ ) en presencia de una serie de titulación de un antígeno no marcado, capturando luego el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpos anti-Fab (ver, por ejemplo, Chen et ál. *J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999). Para establecer las condiciones del ensayo, se recubren placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9.6), y luego se bloquean con albúmina de suero bovino al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), se mezcla un antígeno marcado con [ $^{125}\text{I}$ ] 100 pM o 26 pM con diluciones en serie

de un Fab de interés (por ejemplo, congruente con la evaluación del anticuerpo contra VEGF, Fab-12, en Presta et ál. *Cancer Res.* 57:4593-4599, 1997). Luego se incuba el Fab de interés durante la noche; no obstante, la incubación puede continuar durante un período de tiempo mayor (por ejemplo, alrededor de 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio.

- 5 Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Luego se retira la solución y se lava la placa ocho veces con polisorbato 20 al 0.1 % (TWEEN®-20) en PBS. Una vez secas las placas, se agregan 150 µl/pocillo de centelleante (MICROSCINT-20™; Packard) y se realiza el conteo de las placas en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen  
10 las concentraciones de cada Fab que producen menos o el equivalente de 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

- De acuerdo con otra modalidad, la  $K_D$  se mide con un ensayo de resonancia de plasmones superficiales BIACORE®. Por ejemplo, un ensayo que utiliza un BIACORE®-2000 o un  
15 BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) se lleva a cabo a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). En una modalidad, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE Inc.) con clorhidrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, a 5 µg/ml (~ 0.2 µM)  
20 antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 µl/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de la proteína acoplada. Tras la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para realizar mediciones cinéticas, se inyectan diluciones dobles en serie de Fab (de 0.78 nM a 500 nM) en solución salina amortiguada con fosfato (PBS) con tensioactivo polisorbato 20 (TWEEN®-20) (PBST) al  
25 0.05 % a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 µl/min. Se calculan velocidades de asociación ( $k_{on}$ ) y velocidades de disociación ( $k_{off}$ ) con un modelo de unión Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIACORE® versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo de los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) se calcula como la relación  $k_{off}/k_{on}$ . Ver, por ejemplo, Chen et ál.  
30 (*J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999). Si la velocidad de asociación supera  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  en el ensayo de resonancia de plasmones superficiales antemencionado, la velocidad de asociación puede

determinarse mediante el uso de una técnica de inactivación fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo contra antígenos 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según la medición en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con detención de flujo (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

En algunas modalidades, la  $K_D$  se mide mediante el uso del ensayo de SPR BIACORE®, por ejemplo, tal como se describe en el apartado (A)(vii) del Ejemplo 1. En algunas modalidades, el ensayo de SPR puede utilizar un dispositivo BIAcore® T200 o un dispositivo equivalente. En algunas modalidades, se inmovilizan chips de detección BIAcore® Series S CM5 (o chips de detección equivalentes) con anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG humana (Fc) y luego se capturan anticuerpos contra triptasa en la celda de flujo. Se inyectan diluciones triples en serie del monómero de triptasa humana beta 1 marcada con His (SEQ ID NO: 128) a una velocidad de flujo de 30  $\mu$ l/min. Cada muestra se analiza con una asociación de 3 min y una disociación de 10 min. El ensayo se lleva a cabo a 25 °C. Luego de cada inyección, se regenera el chip mediante el uso de  $MgCl_2$  3 M. La respuesta de unión se corrige al restar las unidades de respuesta (RU) de una celda de flujo que capturan una IgG no pertinente a una densidad similar. Se utiliza el modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis de los parámetros cinéticos.

## 2. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, de modo no taxativo, fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y scFv, y otros fragmentos que se describen más adelante. Para una reseña sobre determinados fragmentos de anticuerpos, ver Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134 (2003). Se puede encontrar una reseña sobre fragmentos scFv, por ejemplo, en Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, tomo 113, Rosenberg y Moore eds., (Springer-Verlag, Nueva York), páginas 269-315, (1994); ver también WO 93/16185 y la

patente estadounidense n.º 5,571,894 y 5,587,458. Para una mención sobre fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate y que poseen mayor semivida in vivo, ver la patente estadounidense n.º 5,869,046.

- 5 Los diacuerpos son fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno que pueden ser bivalentes o biespecíficos. Ver, por ejemplo, EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003; y Hollinger et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448, 1993. También se describen triacuerpos y tetracuerpos en Hudson et ál. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.

10

Los anticuerpos de un solo dominio son fragmentos de anticuerpos que comprenden la totalidad o una parte del dominio variable de cadena pesada o la totalidad o una parte del dominio variable de cadena ligera de un anticuerpo. En determinadas modalidades, un anticuerpo de un solo dominio es un anticuerpo humano de un solo dominio (ver, por ejemplo, 15 la patente estadounidense n.º 6,248,516 B1).

20

Los fragmentos de anticuerpos pueden elaborarse mediante varias técnicas, que incluyen, de modo no taxativo, la digestión proteolítica de un anticuerpo intacto, así como la producción mediante células hospedadoras recombinantes (por ejemplo, *E. coli* o fago), tal como se describe en la presente.

### 3. Anticuerpos quiméricos y humanizados

25

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo quimérico. Se describen anticuerpos quiméricos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4,816,567 y Morrison et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984). En un ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable no humana (por ejemplo, una región variable derivada de un ratón, rata, hámster, conejo o primate no humano, tal como un mono) y una región constante humana. En un ejemplo adicional, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo “con conmutación de clase”, en el que la clase o subclase se cambió de 30 forma que no es la del anticuerpo original. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de

unión al antígeno de estos.

- En determinadas modalidades, un anticuerpo quimérico es un anticuerpo humanizado. Típicamente, un anticuerpo no humano se humaniza para reducir la inmunogenicidad a seres humanos, a la vez que mantiene la especificidad y afinidad del anticuerpo no humano original. Generalmente, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las HVR (o partes de estas) derivan de un anticuerpo no humano y las FR (o partes de estas) derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado comprende también opcionalmente al menos una parte de una región constante humana. En algunas modalidades, se sustituyen algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que derivan los residuos de HVR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.
- Los anticuerpos humanizados y los métodos para elaborarlos se resumen, por ejemplo, en Almagro et ál. *Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008 y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann et ál. *Nature* 332:323-329, 1988; Queen et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989; patentes estadounidenses n.º 5,821,337, 7,527,791, 6,982,321 y 7,087,409; Kashmiri et ál. *Methods* 36:25-34, 2005 (que describe el injerto de región determinante de la especificidad (SDR)); Padlan *Mol. Immunol.* 28:489-498, 1991 (que describe el “revestimiento”); Dall’Acqua et ál. *Methods* 36:43-60, 2005 (que describe la “trasposición de FR”); y Osbourn et ál. *Methods* 36:61-68, 2005 y Klimka et ál. *Br. J. Cancer*, 83:252-260, 2000 (que describe el enfoque de “selección guiada” para la trasposición de FR).
- Las regiones marco humanas que pueden utilizarse para la humanización incluyen, de modo no taxativo: regiones marco seleccionadas mediante el uso del método “de mejor ajuste” (ver, por ejemplo, Sims et ál. *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); regiones marco que derivan de la secuencia de consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena ligera o pesada (ver, por ejemplo, Carter et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, 1992; y Presta et ál. *J. Immunol.*, 151:2623, 1993); regiones marco humanas maduras (mutadas de forma somática) o regiones marco de línea germinal humanas (ver, por

ejemplo, Almagro et ál. *Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008); y regiones marco derivadas de la selección de bibliotecas de FR (ver, por ejemplo, Baca et ál. *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684, 1997 y Rosok et ál. *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618, 1996).

#### 5 4. Anticuerpos humanos

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanos pueden producirse mediante el uso de diversos métodos conocidos en la técnica. En términos generales, los anticuerpos humanos se describen en van  
10 Dijk et ál. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001 y Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459, 2008.

Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la administración de un inmunógeno a un animal transgénico que se modificó para producir anticuerpos humanos intactos o  
15 anticuerpos intactos con regiones variables humanas como respuesta a una exposición a antígenos. Dichos animales típicamente contienen la totalidad o parte de los locus de inmunoglobulina humana, que reemplazan los locus de inmunoglobulina endógena o están presentes de forma extracromosómica o integrados de forma aleatoria a los cromosomas del animal. En dichos ratones transgénicos, generalmente se inactivan los locus de  
20 inmunoglobulina endógena. Para reseñas de métodos para obtener anticuerpos humanos de animales transgénicos, ver Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125, 2005. Ver también, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6,075,181 y 6,150,584 que describen tecnología XENOMOUSE™; la patente estadounidense n.º 5,770,429 que describe tecnología HUMAB®, la patente estadounidense n.º 7,041,870 que describe tecnología K-M MOUSE® y la  
25 publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US 2007/0061900 que describe tecnología VELOCIMOUSE®. Las regiones variables humanas de anticuerpos intactos generados por dichos animales pueden modificarse de forma adicional, por ejemplo, mediante una combinación con una región constante humana diferente.

30 Los anticuerpos humanos también pueden elaborarse mediante métodos a base de hibridoma. Se describieron las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma

humano/ratón para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (ver, por ejemplo, Kozbor *J. Immunol.* 133:3001, 1984; Brodeur et ál. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner et ál. *J. Immunol.* 147: 86, 1991). También se describen anticuerpos humanos generados mediante tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos en Li et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562, 2006. Otros métodos incluyen los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.189.826 (que describe la producción de anticuerpos IgM humanos monoclonales de las líneas celulares de hibridoma) y Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268, 2006 (que describe hibridomas humano-humano). La tecnología de hibridomas humanos (tecnología Trioma) también se describe en Vollmers et ál. *Histology and Histopathology* 20(3):927-937, 2005 y Vollmers et ál. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(3):185-91, 2005.

Los anticuerpos humanos pueden generarse también mediante el aislamiento de las secuencias de dominio variable del clon de Fv que se seleccionan de bibliotecas de expresión en fagos derivados de humanos. Estas secuencias de dominio variable pueden combinarse luego con un dominio constante humano deseado. A continuación se describen las técnicas para seleccionar anticuerpos humanos de bibliotecas de anticuerpos.

## 5. Anticuerpos derivados de bibliotecas

Los anticuerpos de la invención se pueden aislar mediante cribado de bibliotecas combinatorias en busca de anticuerpos con la actividad o actividades deseadas. Por ejemplo, se conoce en la técnica una variedad de métodos para generar bibliotecas de expresión en fagos y analizar dichas bibliotecas en busca de anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos métodos se analizan, por ejemplo, en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) y se describen adicionalmente, por ejemplo, en McCafferty et ál. *Nature* 348:552-554, 1990; Clackson et ál. *Nature* 352: 624-628, 1991; Marks et ál. *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1992; Marks et ál. in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et ál. *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee et ál. *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-

1093, 2004; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472, 2004; y Lee et ál. *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132, 2004.

En determinados métodos de expresión en fagos, se clonan repertorios de genes de VH y VL en forma independiente mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se recombinan en forma aleatoria en bibliotecas de fagos, que se pueden analizar luego para hallar fagos de unión al antígeno, tal como se describe en Winter et ál. *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455, 1994. Los fagos presentan típicamente fragmentos de anticuerpos, ya sea como fragmentos Fv de cadena simple (scFv) o como fragmentos Fab. Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan al inmunógeno anticuerpos de alta afinidad sin que sea necesaria la construcción de hibridomas. De manera alternativa, es posible clonar el repertorio sin inmunización (por ejemplo, humano) para proporcionar una única fuente de anticuerpos para un amplio espectro de xenoantígenos y autoantígenos sin ningún tipo de inmunización, tal como se describe en Griffiths et ál. *EMBO J.* 12: 725-734, 1993. Finalmente, las bibliotecas sin inmunización también pueden elaborarse de forma sintética al clonar segmentos génicos V sin reorganización a partir de células madre, y mediante el uso de cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones HVR3 altamente variables y para lograr la reorganización *in vitro*, tal como se describe en Hoogenboom et ál. *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Las publicaciones de patente que describen bibliotecas de fagos de anticuerpos humanos incluyen, por ejemplo: la patente estadounidense n.º 5,750,373, y las publicaciones de patentes estadounidenses n.º 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 y 2009/0002360.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo aislados de bibliotecas de anticuerpos humanos se consideran en la presente anticuerpos humanos o fragmentos de anticuerpos humanos.

## 6. Anticuerpos multiespecíficos

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos multiespecíficos son anticuerpos monoclonales que tienen especificidades de unión para al menos dos sitios

diferentes. En determinadas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de triptasa. En determinadas modalidades, una de las especificidades de unión es para triptasa y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica). En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítomos diferentes de triptasa. En otras modalidades, una de las especificidades de unión es para la triptasa (por ejemplo, triptasa humana, por ejemplo, triptasa humana beta) y la otra es para cualquier otro antígeno (por ejemplo, una segunda molécula biológica, por ejemplo, IL-13, IL-4, IL-5, IL-17, IL-33, IgE, principal de M1, CRTH2 o TRPA). Por consiguiente, el anticuerpo biespecífico puede tener una especificidad de unión para la triptasa e IL-13; triptasa e IL-4; triptasa e IL-5; triptasa e IL-17 o triptasa e IL-33. En particular, el anticuerpo biespecífico puede tener una especificidad de unión para triptasa e IL-13 o triptasa e IL-33. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos.

Por ejemplo, en algunas instancias, un anticuerpo biespecífico incluye un primer dominio de unión que se une a triptasa y un segundo dominio de unión que se une a IL-13. En algunas modalidades, el primer dominio de unión que se une a triptasa puede incluir, por ejemplo, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2GMX_3$  (SEQ ID NO: 1), donde  $X_1$  es Asp o Ser,  $X_2$  es Tyr o Phe, y  $X_3$  es Val o His; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos  $RX_1X_2X_3DWYFDV$  (SEQ ID NO: 3), donde  $X_1$  es Asn o Asp,  $X_2$  es Tyr o Asn, y  $X_3$  es Asp o Tyr; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En algunos casos, el segundo dominio de unión que se une a IL-13, por ejemplo, puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR

seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos AYSVN (SEQ ID NO: 84); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO: 85); (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DGYYPYAMDND (SEQ ID NO: 86); (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 87); (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LASNLES (SEQ ID NO: 88); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 89) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 84-89. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR del anticuerpo contra IL-13 lebrikizumab.

Por ejemplo, en algunas instancias, el primer dominio de unión que se une a triptasa comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), tal como hu31a.v11. En algunos casos, el segundo dominio de unión que se une a IL-13, por ejemplo, puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos AYSVN (SEQ ID NO: 84); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos MIWGDGKIVYNSALKS (SEQ ID NO: 85); (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos DGYYPYAMDND (SEQ ID NO: 86); (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASKSVDSYGNSFMH (SEQ ID NO: 87); (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos LASNLES (SEQ ID NO: 88); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQNNEDPRT (SEQ ID NO: 89). En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis

HVR del anticuerpo contra IL-13 lebrikizumab. En algunas modalidades, el primer dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos del VH y/o VL de hu31a.v11 y el segundo dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos del VH y/o VL del anticuerpo contra IL-13 lebrikizumab.

5

Cualquiera de los anticuerpos biespecíficos contra IL-13/triptasa antemencionados pueden incluir un primer dominio de unión que se une a triptasa que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 10 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID 15 NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Cualquiera de los anticuerpos biespecíficos contra IL-13/triptasa antemencionados pueden incluir un segundo dominio de unión que se une a IL-13 que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 20 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 90 o la SEQ ID NO: 114; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID 25 NO: 91 o la SEQ ID NO: 115; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas instancias, el segundo dominio de unión comprende el dominio VH y/o VL de lebrikizumab.

Como otro ejemplo, en algunas instancias, un anticuerpo biespecífico incluye un primer 30 dominio de unión que se une a triptasa y un segundo dominio de unión que se une a IL-33. El segundo dominio de unión que se une a IL-33 puede incluir cualquiera de los anticuerpos

contra IL-33 descritos, por ejemplo, en la publicación de patente estadounidense n.º 2016/0168242, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En algunas modalidades, el primer dominio de unión que se une a triptasa puede incluir, por ejemplo, al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos  $X_1X_2GMX_3$  (SEQ ID NO: 1), donde  $X_1$  es Asp o Ser,  $X_2$  es Tyr o Phe, y  $X_3$  es Val o His; (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (a) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos  $RX_1X_2X_3DWYFDV$  (SEQ ID NO: 3), donde  $X_1$  es Asn o Asp,  $X_2$  es Tyr o Asn, y  $X_3$  es Asp o Tyr; (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 1-6. En algunos casos, el segundo dominio de unión que se une a IL-33, por ejemplo, puede incluir al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SFSMS (SEQ ID NO: 120); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO: 121); (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANYGNWFFEV (SEQ ID NO: 122); (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO: 123); (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASNRGS (SEQ ID NO: 124); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 125) o una combinación de una o más de las HVR anteriores y una o más variantes de estas con una identidad de secuencia de al menos alrededor de 80 % (por ejemplo, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad) con respecto a cualquiera de las SEQ ID NO: 120-125. En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR del anticuerpo contra IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I.

Por ejemplo, en algunas instancias, el primer dominio de unión que se une a triptasa comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis regiones hipervariables (HVR) que se seleccionan de: (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6), tal como hu31a.v11. En algunos casos, el segundo dominio de unión que se une a IL-33, por ejemplo, puede comprender al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR seleccionadas de (a) HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos SFSMS (SEQ ID NO: 120); (b) HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos TISGGKTFTDYVDSVKG (SEQ ID NO: 121); (c) HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos ANYGNWFFEY (SEQ ID NO: 122); (d) HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASESVAKYGLSLLN (SEQ ID NO: 123); (e) HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos AASNRRGS (SEQ ID NO: 124); y (f) HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQSKEVPFT (SEQ ID NO: 125). En algunas modalidades, el segundo dominio de unión comprende una, dos, tres, cuatro, cinco o seis HVR del anticuerpo contra IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I. En algunas modalidades, el primer dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos del VH y/o VL de hu31a.v11 y el segundo dominio de unión comprende la secuencia de aminoácidos del VH y/o VL del anticuerpo contra IL-33 10C12.38.H6.87Y.58I.

Cualquiera de los anticuerpos biespecíficos contra IL-33/triptasa antemencionados pueden incluir un primer dominio de unión que se une a triptasa que comprende (a) un dominio VH que comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 9; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 10.

90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 10; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). Cualquiera de los anticuerpos biespecíficos contra IL-33/triptasa antemencionados pueden incluir un segundo dominio de unión que se une a IL-33 que comprende (a) un dominio VH que comprende una  
 5 secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 126; (b) un dominio VL que comprende una secuencia de aminoácidos que posee una  
 10 identidad de secuencia de al menos 80 % (por ejemplo, una identidad de secuencia de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %), o la secuencia de la SEQ ID NO: 127; o (c) un dominio VH como en (a) y un dominio VL como en (b). En algunas instancias, el segundo dominio de unión comprende el dominio VH y/o VL de 10C12.38.H6.87Y.58I.

15 Las técnicas para la elaboración de anticuerpos multiespecíficos incluyen, de modo no taxativo, la coexpresión recombinante de dos pares de cadena ligera y de cadena pesada de inmunoglobulina con especificidades distintas (ver Milstein et ál. *Nature* 305: 537, 1983; WO 93/08829; y Traunecker et ál. *EMBO J.* 10: 3655, 1991) y modificación de “botón en ojal” (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,731,168). Los anticuerpos multiespecíficos  
 20 también pueden generarse al diseñar efectos de direccionamiento electrostático para crear moléculas heterodiméricas de Fc de anticuerpos (WO 2009/089004A1); al reticular dos o más anticuerpos o fragmentos (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4,676,980, y Brennan et ál. *Science*, 229: 81, 1985); mediante el uso de cremalleras de leucina para producir anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Kostelny et ál. *J. Immunol.*, 148(5):1547-  
 25 1553, 1992); mediante el uso de tecnología de “diacuerpos” para confeccionar fragmentos de anticuerpos biespecíficos (ver, por ejemplo, Hollinger et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993); mediante el uso de dímeros Fv de cadena simple (scFv) (ver, por ejemplo, Gruber et ál. *J. Immunol.* 152:5368, 1994); y la preparación de anticuerpos triespecíficos tal como se describió, por ejemplo, en Tutt et ál. *J. Immunol.* 147: 60, 1991.

30

También se incluyen en la presente anticuerpos modificados genéticamente con tres o más

sitios de unión a antígenos funcionales, que incluyen “anticuerpos pulpo” (ver, por ejemplo, US 2006/0025576A1).

- 5 El anticuerpo o fragmento descrito en la presente incluye también un “Fab de doble acción” o “DAF” que comprende un sitio de unión al antígeno que se une a triptasa, así como otro antígeno distinto (ver, por ejemplo, US 2008/0069820).

### *Botones en ojal*

- 10 El uso de botones en ojal como método para la producción de anticuerpos multiespecíficos se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 5.731.168, WO2009/089004, US2009/0182127, US2011/0287009, Marvin y Zhu, *Acta Pharmacol. Sin.* (2005) 26(6):649-658, y Kontermann (2005) *Acta Pharmacol. Sin.* 26:1-9. A continuación se brinda una descripción breve y no taxativa.

15

- Una “protuberancia” hace referencia a al menos una cadena lateral de aminoácido que se proyecta desde la interfaz de un primer polipéptido y, por lo tanto, se puede colocar en una cavidad de compensación en la interfaz adyacente (es decir, la interfaz de un segundo polipéptido) para estabilizar el heteromultímero y así favorecer la formación de
- 20 heteromultímeros con respecto a la formación de homomultímeros, por ejemplo. La protuberancia puede existir en la interfaz original o puede introducirse de forma sintética (por ejemplo, al alterar el ácido nucleico que codifica la interfaz). En algunas modalidades, un ácido nucleico que codifica la interfaz del primer polipéptido se altera para codificar la protuberancia. Para lograr esto, el ácido nucleico que codifica al menos un residuo de
- 25 aminoácido “original” en la interfaz del primer polipéptido se reemplaza con ácido nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido “importado” con un mayor volumen de cadena lateral que el residuo de aminoácido original. Se entenderá que puede haber más de un residuo de importación original y correspondiente. Los volúmenes de cadena lateral de los diversos residuos amino se muestran, por ejemplo, en la Tabla 1 de US 2011/0287009 o
- 30 Tabla 1 de la patente estadounidense n.º 7,642,228.

En algunas modalidades, los residuos importados para la formación de una protuberancia son residuos de aminoácidos de origen natural seleccionados de arginina (R), fenilalanina (F), tirosina (Y) y triptófano (W). En algunas modalidades, un residuo importado es triptófano o tirosina. En algunas modalidades, el residuo original para la formación de la protuberancia  
5 tiene un volumen de cadena lateral pequeño, tal como alanina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, treonina o valina. Ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,642,228.

Una “cavidad” hace referencia a al menos una cadena lateral de aminoácido que se embute en la interfaz de un segundo polipéptido y, por lo tanto, puede recibir una protuberancia  
10 correspondiente en la interfaz adyacente de un primer polipéptido. La cavidad puede existir en la interfaz original o puede introducirse de forma sintética (por ejemplo, al alterar el ácido nucleico que codifica la interfaz). En algunas modalidades, el ácido nucleico que codifica la interfaz del segundo polipéptido se altera para codificar la cavidad. Para lograr esto, el ácido  
15 nucleico que codifica al menos un residuo de aminoácido “original” en la interfaz del segundo polipéptido se reemplaza con ADN que codifica al menos un residuo de aminoácido “importado” con un menor volumen de cadena lateral que el residuo de aminoácido original. Se entenderá que puede haber más de un residuo de importación original y correspondiente. En algunas modalidades, los residuos importados para la formación de una cavidad son residuos de aminoácidos de origen natural seleccionados de alanina (A), serina (S), treonina (T) y valina  
20 (V). En algunas modalidades, un residuo importado es serina, alanina o treonina. En algunas modalidades, el residuo original para la formación de la cavidad tiene un volumen de cadena lateral considerable, como tirosina, arginina, fenilalanina o triptófano.

La protuberancia se “puede colocar” en la cavidad, lo que significa que la ubicación espacial  
25 de la protuberancia y la cavidad en la interfaz de un primer polipéptido y un segundo polipéptido, respectivamente, y los tamaños de la protuberancia y la cavidad son tales que la protuberancia pueda ubicarse en la cavidad sin alterar de forma significativa la asociación normal del primer y el segundo polipéptido de la interfaz. Dado que las protuberancias tales como Tyr, Phe y Trp no se extienden típicamente de forma perpendicular desde el eje de la  
30 interfaz y tienen conformaciones preferidas, la alineación de una protuberancia con una cavidad correspondiente, en algunos casos, puede basarse en la realización de un modelo del

par de protuberancia/cavidad basado en una estructura tridimensional tal como la obtenida mediante cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés). Esto se puede lograr mediante el uso de diversos métodos aceptados en la técnica.

- 5 En algunas modalidades, una mutación de botón en una región constante de IgG1 es T366W. En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende una o más mutaciones que se seleccionan de T366S, L368A e Y407V. En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG1 comprende T366S, L368A e Y407V.

10

En algunas modalidades, una mutación de botón en una región constante de IgG4 es T366W. En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende una o más mutaciones que se seleccionan de T366S, L368A e Y407V. En algunas modalidades, una mutación de ojal en una región constante de IgG4 comprende T366S,

15

L368A e Y407V.

## 7. Variantes de anticuerpos

20

En determinadas modalidades, se contemplan las variantes de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos que se proporcionan en la presente. Por ejemplo, se puede desear mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo, tal como la actividad inhibidora. Las variantes de secuencias de aminoácidos de un anticuerpo pueden prepararse mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica al anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por

25 ejemplo, eliminaciones de residuos, inserciones en estos y/o sustituciones de estos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución puede realizarse para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, la unión a antígenos.

30

### a) Variantes de sustitución, inserción y eliminación

En determinadas modalidades, se proporcionan variantes de anticuerpos que presentan una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las HVR y las FR. Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 con el título “sustituciones preferidas”. Se proporcionan cambios más sustanciales en la Tabla 1 con el título “ejemplos de sustituciones” y tal como se describe más adelante con respecto a las clases de cadenas laterales de aminoácidos. Se pueden introducir sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y analizar los productos para determinar una actividad deseada, por ejemplo, mantenimiento/mejora de unión al antígeno, disminución de inmunogenicidad o mejora de ADCC o CDC.

**Tabla 1**

| Residuo original | Ejemplos de sustituciones           | 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)          | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr        | Tyr                      |
| Pro (P)          | Ala                                 | Ala                      |
| Ser (S)          | Thr                                 | Thr                      |
| Thr (T)          | Val; Ser                            | Ser                      |



Los aminoácidos pueden agruparse de acuerdo con propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbicos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

5 (2) hidrofílicos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) ácido: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lys, Arg;

(5) residuos afectan la orientación de la cadena: Gly, Pro;

(6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

10

Las sustituciones no conservadoras implican el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

15

Un tipo de variante sustitutiva implica la sustitución de uno o más residuos de regiones hipervariables de un anticuerpo original (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado).

En general, la o las variantes resultantes seleccionadas para estudios más detallados tendrán modificaciones (por ejemplo, mejoras) en determinadas propiedades biológicas (por ejemplo,

aumento de afinidad, disminución de inmunogenicidad) en comparación con el anticuerpo original y/o conservarán sustancialmente determinadas propiedades biológicas del anticuerpo

20

original. Un ejemplo de variante sustitutiva es un anticuerpo madurado por afinidad, el cual puede generarse de manera conveniente, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de

maduración por afinidad basada en la visualización de fagos tales como aquellas que se describen en la presente. En resumen, se mutan uno o más residuos de HVR, se expresan los

anticuerpos variantes en fagos y se realiza un análisis en busca de una actividad biológica en particular (por ejemplo, afinidad de unión).

25

Pueden realizarse alteraciones (por ejemplo, sustituciones) en las HVR, por ejemplo, para mejorar la afinidad de anticuerpos. Dichas alteraciones pueden realizarse en “puntos de

interés” de HVR, es decir, residuos codificados por codones que se someten a mutación a alta frecuencia durante el proceso de maduración somática (ver, por ejemplo, Chowdhury,

30

*Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008), y/o residuos que entran en contacto con el antígeno,

donde la variante resultante VH o VL se evalúa para determinar la afinidad de unión. La maduración por afinidad mediante construcción y nueva selección de bibliotecas secundarias se ha descrito, por ejemplo, en Hoogenboom et ál. en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et ál., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001). En algunas modalidades de la maduración por afinidad, la diversidad se introduce en los genes variables elegidos para su maduración mediante cualquiera de una variedad de métodos (por ejemplo, PCR susceptible a errores, transposición de cadena o mutagénesis dirigida por oligonucleótidos). Luego se crea una biblioteca secundaria. Luego se analiza la biblioteca para identificar cualesquiera variantes de anticuerpo con la afinidad deseada. Otro método para introducir diversidad implica enfoques dirigidos a HVR, en los que se distribuyen de forma aleatoria varios residuos HVR (por ejemplo, 4-6 residuos cada vez). Los residuos HVR implicados en la unión al antígeno pueden identificarse específicamente, por ejemplo, mediante la utilización de mutagénesis por barrido de alanina o modelado. En particular HVR-H3 y HVR-L3 son elegidos como objetivo.

En determinadas modalidades, pueden ocurrir sustituciones, inserciones o eliminaciones dentro de una o más HVR siempre que tales alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno. Por ejemplo, pueden realizarse en las HVR alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras que se proporcionan en la presente) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión. Estas alteraciones, por ejemplo, pueden estar fuera de los residuos que entran en contacto con el antígeno en las HVR. En determinadas modalidades de las secuencias VH y VL variantes proporcionadas anteriormente, cada HVR se encuentra sin alteraciones o contiene no más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Un método útil para identificar residuos o regiones de un anticuerpo que pueden elegirse como objetivos para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido de alanina", tal como se describe en Cunningham et ál. *Science* 244:1081-1085, 1989. En este método, un residuo o grupo de residuos objetivo (por ejemplo, residuos cargados tales como Arg, Asp, His, Lys y Glu) son identificados y reemplazados por un aminoácido neutro o con carga negativa (por ejemplo, Ala o polialanina) para determinar si se ve afectada la interacción del

anticuerpo con el antígeno. Pueden introducirse otras sustituciones en las ubicaciones de aminoácidos que demuestren sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. De manera alternativa o adicional, una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo identifica los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Tales residuos de contacto y residuos limitantes pueden elegirse como objetivo o eliminarse como candidatos para sustitución. Pueden analizarse las variantes para determinar si contienen o no las propiedades deseadas.

Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que varían en cuanto a la longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como también inserciones intrasecuencia de un único o de múltiples residuos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones en extremos incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo del extremo N. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión a los extremos N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en suero.

#### *b) Variantes de glicosilación*

En determinadas modalidades, un anticuerpo proporcionado en la presente se altera para aumentar o disminuir la medida en que se glicosila el anticuerpo. La adición o eliminación de sitios de glicosilación a un anticuerpo puede lograrse de forma conveniente al alterar la secuencia de aminoácidos de forma tal que se creen o eliminen uno o más sitios de glicosilación.

En los casos en que el anticuerpo comprende una región Fc, el carbohidrato unido a este puede modificarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamíferos típicamente comprenden un oligosacárido ramificado y de doble antena que se une generalmente a través de un enlace N a Asn297 del dominio CH2 de la región Fc. Ver, por ejemplo, Wright et ál. *TIBTECH* 15:26-32, 1997. El oligosacárido puede incluir varios carbohidratos, por ejemplo, manosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como también una fucosa unida a una GlcNAc en el “tallo” de la estructura del oligosacárido de dos antenas. En algunas modalidades, las modificaciones del oligosacárido

en un anticuerpo de la invención pueden realizarse para crear variantes de anticuerpos con determinadas propiedades mejoradas.

En una modalidad, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de carbohidrato que carece de fucosa unida (de forma directa o indirecta) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en tal anticuerpo puede ser de 1 % a 80 %, de 1 % a 65 %, de 5 % a 65 % o de 20 % a 40 %. La cantidad de fucosa se determina al calcular la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, en comparación con la suma de todas las glicoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y de alta manosa) tal como se mide mediante espectrómetro de masas MALDI-TOF, tal como se describe, por ejemplo, en WO 2008/077546. Asn297 se refiere al residuo de asparagina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc (numeración Eu de los residuos de la región Fc); sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente en  $\pm 3$  aminoácidos antes o después de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una mejor función de ADCC. Ver, por ejemplo, las publicaciones de patente estadounidense n.º 2003/0157108 y 2004/0093621. Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos “desfucosilados” o “con deficiencia de fucosa” incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki et ál. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004. Los ejemplos de líneas celulares capaces de producir anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO Lec13 con deficiencia en fucosilación proteica (Ripka et ál. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545, 1986; US 2003/0157108; y WO 2004/056312 A1, especialmente en el Ejemplo 11), y las líneas celulares inactivadas, tales como el gen alfa-1.6-fucosiltransferasa, *FUT8*, células CHO inactivadas (ver, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et ál. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004; Kanda et ál. *Biotechnol. Bioeng.* 94(4):680-688, 2006; y WO 2003/085107).

Además se proporcionan variantes de anticuerpos con oligosacáridos bisectados, por ejemplo,

donde un oligosacárido con dos antenas unido a la región Fc del anticuerpo se bisecta con GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener fucosilación reducida y/o mejor función de ADCC. Los ejemplos de dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 2003/011878; patente estadounidense n.º 6,602,684 y US 2005/0123546. También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una mejor función de CDC. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en WO 1997/30087, WO 1998/58964 y WO 1999/22764.

#### 10 c) Variantes de región Fc

En determinadas modalidades, se pueden introducir una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de un anticuerpo proporcionado en la presente, generando así una variante de la región Fc. La variante de región Fc puede comprender una secuencia de región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos.

En determinadas modalidades, la invención contempla una variante de anticuerpo que posee algunas pero no todas las funciones efectoras, lo que lo convierte en un candidato deseable para aplicaciones en las cuales la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante; sin embargo, determinadas funciones efectoras (tales como complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. Se pueden realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/pérdida de las actividades de CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo ensayos de unión al receptor Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a FcγR (por lo tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero mantiene la capacidad de unión a FcRn. Las principales células para mediar células ADCC, NK, solamente expresan Fc(RIII, mientras que los monocitos expresan Fc(RI, Fc(RII y Fc(RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch et ál. *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Se describen ejemplos no taxativos de ensayos *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés en la patente

estadounidense n.º 5,500,362 (ver, por ejemplo, Hellstrom, et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:7059-7063, 1986 y Hellstrom et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:1499-1502, 1985; patente estadounidense n.º 5,821,337 (ver Bruggemann et ál. *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, 1987). De manera alternativa, pueden emplearse métodos de ensayos no radiactivos (ver, por ejemplo, ensayo de citotoxicidad no radiactivo ACTI™ para la citometría de flujo (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; y ensayo de citotoxicidad CytoTox 96® no radiactivo (Promega, Madison, WI). Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De manera alternativa o adicional, es posible evaluar la actividad de ADCC de la molécula de interés *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998. También se pueden llevar a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo no puede unirse a C1q y, por lo tanto, carece de actividad CDC. Ver, por ejemplo, ELISA de unión a C1q y C3c en WO 2006/029879 y WO 2005/100402. Para evaluar la activación de complementos, puede realizarse un ensayo con CDC (ver, por ejemplo, Gazzano-Santoro et ál. *J. Immunol. Methods* 202:163, 1996; Cragg et ál. *Blood* 101:1045-1052, 2003; y Cragg et ál. *Blood* 103:2738-2743, 2004). También se puede realizar la unión a FcRn y las determinaciones *in vivo* de eliminación/semivida mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Petkova et ál. *Intl. Immunol.* 18(12):1759-1769, 2006).

Los anticuerpos con función efectora reducida incluyen aquellos con sustitución de uno o más residuos de la región Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 y 329 (patente estadounidense n.º 6,737,056). Dichos mutantes Fc incluyen los mutantes Fc con sustituciones en dos o más posiciones de aminoácidos 265, 269, 270, 297 y 327, lo que incluye el mutante Fc también denominado "DANA" con sustitución de los residuos 265 y 297 con alanina (patente estadounidense n.º 7,332,581).

Se describen determinadas variantes de anticuerpos con unión a FcR mejorada o disminuida (ver, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,737,056; WO 2004/056312 y Shields et ál. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604, 2001).

En determinadas modalidades, una variante de anticuerpo comprende una región Fc con una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración EU de residuos).

- 5 En algunas modalidades, se realizan modificaciones en la región Fc que dan como resultado la unión a C1q modificada (es decir, ya sea mejorada o disminuida) y/o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC), por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense n.º 6,194,551, WO 99/51642, e Idusogie et ál. *J. Immunol.* 164: 4178-4184, 2000.

10

Se describen anticuerpos con mayores semividas y mejor unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), el cual es responsable de la transferencia de IgG materno al feto (Guyer et ál. *J. Immunol.* 117:587, 1976 y Kim et ál. *J. Immunol.* 24:249, 1994) en US2005/0014934. Esos anticuerpos comprenden una región Fc con una o más sustituciones en ella que mejoran la

15 unión de la región Fc a FcRn. Dichas variantes de Fc incluyen las que tienen sustituciones en uno o más de los residuos de la región Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 o 434, por ejemplo, sustitución del residuo de la región Fc 434 (patente estadounidense n.º 7,371,826).

- 20 Véase también Duncan et ál. *Nature* 322:738-40, 1988; patentes estadounidenses n.º 5,648,260 y 5,624,821; y WO 94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc.

*d) Variantes de anticuerpos modificados genéticamente con cisteína*

25

En determinadas modalidades, puede ser deseable crear anticuerpos modificados genéticamente con cisteína, por ejemplo, “thioMAb”, en los cuales uno o más residuos de un anticuerpo se sustituyen con residuos de cisteína. En modalidades particulares, los residuos sustituidos se producen en sitios accesibles del anticuerpo. Al sustituir esos residuos con

30 cisteína, se ubican grupos tiol reactivos en sitios accesibles del anticuerpo y se pueden utilizar para conjugar el anticuerpo con otros restos, por ejemplo restos de fármacos o restos

fármaco-enlazadores, para crear un inmunoconjugado, tal como se describe adicionalmente en el presente. En determinadas modalidades, uno o más de los siguientes residuos puede sustituirse con cisteína: V205 (numeración Kabat) de la cadena ligera; A118 (numeración EU) de la cadena pesada; y S400 (numeración EU) de la región Fc de cadena pesada. Los anticuerpos modificados genéticamente con cisteína pueden generarse como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7,521,541.

*e) Derivados de anticuerpos*

- 10 En determinadas modalidades, se puede modificar adicionalmente un anticuerpo proporcionado en la presente para contener restos no proteináceos adicionales que se conocen en la técnica y se encuentran fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivación del anticuerpo incluyen, de modo no taxativo, polímeros solubles en agua. Los ejemplos no taxativos de polímeros solubles en agua incluyen, de modo no taxativo,
- 15 polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímeros de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles
- 20 polioxetilados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de estos. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas de fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar y, de haber más de un polímero unido, estos pueden ser la misma molécula o moléculas diferentes. En general, la cantidad y/o
- 25 tipo de polímeros utilizados para la derivación pueden determinarse en función de consideraciones que incluyen, de modo no taxativo, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utiliza en un tratamiento en condiciones definidas y similares.
- 30 En otra modalidad, se proporcionan conjugados de un anticuerpo y resto no proteináceo que pueden calentarse de manera selectiva mediante exposición a radiación. En una modalidad, el

resto no proteináceo es un nanotubo de carbono (Kam et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605, 2005). La radiación puede ser de cualquier longitud de onda e incluye, de modo no taxativo, longitudes de onda que no dañan las células comunes, pero que calientan el resto no proteináceo a una temperatura en la cual las células próximas al resto no proteináceo del anticuerpo mueren.

### *B. Composiciones y métodos recombinantes*

Los anticuerpos pueden producirse mediante el uso de composiciones y métodos recombinantes, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,816,567. En una modalidad, se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo contra triptasa descrito en la presente. Dicho ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que comprende la VL y/o una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo (por ejemplo, las cadenas ligera y/o pesada del anticuerpo). En otra modalidad, se proporcionan uno o más vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden dicho ácido nucleico. En una modalidad adicional, se proporciona una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico. En dicha modalidad, una célula hospedadora comprende (por ejemplo, se transformó con): (1) un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo o (2) un primer vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VL del anticuerpo y un segundo vector que comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la VH del anticuerpo. En una modalidad, la célula hospedadora es eucariota, por ejemplo, una célula de ovario de hámster chino (CHO), una célula 293 o una célula linfocítica (por ejemplo, célula Y0, NS0, Sp20). En una modalidad, se proporciona un método para confeccionar un anticuerpo contra triptasa, donde el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, como se describió anteriormente, en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, recuperar el anticuerpo de la célula hospedadora (o medio de cultivo de células hospedadoras).

Para la producción recombinante de un anticuerpo contra tripsina, se aísla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, por ejemplo, como se describió anteriormente, y se inserta en uno o más vectores para la clonación y/o expresión adicional en una célula hospedadora. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo).

Las células hospedadoras adecuadas para clonar o para la expresión de vectores que codifican anticuerpos incluyen células procariotas o eucariotas descritas en la presente. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc. Para la expresión de fragmentos y polipéptidos de anticuerpos en bacterias, véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,648,237, 5,789,199 y 5,840,523. Ver también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpos en *E. coli*. Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en una fracción soluble y puede purificarse adicionalmente.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son huéspedes de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican anticuerpos, inclusive cepas de hongos y levadura cuyas vías de glicosilación se han “humanizado”, dando lugar a la producción de un anticuerpo con un patrón de glicosilación parcial o completamente humano. Ver Gerngross *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004 y Li et ál. *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo glicosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus que pueden utilizarse junto con células de insectos, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También pueden utilizarse como hospedadores los cultivos celulares vegetales. Ver, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

5

También pueden utilizarse como hospedadoras las células de los vertebrados. Por ejemplo, pueden ser útiles las líneas celulares de mamíferos que se adaptan para crecer en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son las líneas de células CV1 de riñón de mono transformadas mediante SV40 (COS-7), líneas embrionarias de riñón humanas (293 o células 293, tal como se describe, por ejemplo, en Graham et ál. *J. Gen Virol.* 36:59, 1977); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de sertoli de ratón (células TM4, tal como se describe, por ejemplo, en Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI, como se describe, por ejemplo, en Mather et ál., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68, 1982; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), que incluyen células DHFR<sup>-</sup> CHO (Urlaub et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980); y líneas celulares de mieloma tales como Y0, NS0 y Sp2/0. Para una reseña de determinadas líneas celulares hospedadoras de mamíferos adecuadas para la producción de anticuerpos, ver, por ejemplo, Yazaki et ál. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268, 2003.

## 25 C. Ensayos

Los anticuerpos contra triptasa proporcionados en la presente se pueden identificar, evaluar o caracterizar para conocer sus propiedades físicas/químicas y/o actividades biológicas a través de diversos ensayos conocidos en la técnica.

30

### 1. Ensayos de unión y otros ensayos

En un aspecto, se evalúa un anticuerpo contra triptasa de la invención para determinar su actividad de unión al antígeno, por ejemplo, mediante métodos conocidos, tales como ELISA, transferencia Western, resonancia de plasmones superficiales (SPR) y similares.

5

En otro aspecto, pueden utilizarse ensayos de competición para identificar un anticuerpo que compite con un anticuerpo contra triptasa de la invención para unirse a la triptasa. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo competidor se une al mismo epítipo (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo contra triptasa de la invención. En determinadas modalidades, dicho anticuerpo competidor se une a un epítipo superpuesto (por ejemplo, un epítipo lineal o conformacional) que está unido por un anticuerpo contra triptasa de la invención. Los ejemplos de métodos detallados para mapear un epítipo al cual se une un anticuerpo se proporcionan en Morris "Epitope Mapping Protocols", en *Methods in Molecular Biology*, tomo 66 (Humana Press, Totowa, NJ), 1996.

15

En un ejemplo de ensayo de competición, se incuba la triptasa inmovilizada en una solución que comprende un primer anticuerpo marcado que se une a la triptasa y un segundo anticuerpo sin marcar que se evalúa para determinar su capacidad de competir con el primer anticuerpo para la unión a la triptasa. El segundo anticuerpo puede estar presente en un sobrenadante de hibridomas. Como control, se incuba la triptasa inmovilizada en una solución que comprende el primer anticuerpo marcado pero no el segundo anticuerpo sin marcar. Después de la incubación en condiciones que permitan la unión del primer anticuerpo a triptasa, se elimina el exceso de anticuerpo no unido y se mide la cantidad de marcador asociado a la triptasa inmovilizada. Si la cantidad de marcador asociado a la triptasa inmovilizada se ve sustancialmente reducida en la muestra de prueba en comparación con la muestra de control, esto indica que el segundo anticuerpo compite con el primer anticuerpo para la unión a la triptasa. Ver Harlow et ál. *Antibodies: A Laboratory Manual* Cap. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1988.

25

En otra modalidad, la competición de dos anticuerpos para unirse al mismo epítipo se determina mediante la clasificación de epítopos. Por ejemplo, el antígeno marcado se

30

inmoviliza en una superficie sólida y se hace reaccionar con una cantidad saturante de un primer anticuerpo. Luego se agrega un segundo anticuerpo competidor. Toda unión adicional del segundo anticuerpo que se detecte, por ejemplo, mediante OCTET® (ForteBio) u otras técnicas de interferometría de biocapas (BLI) indica que los dos anticuerpos se unen a epítopos separados no superpuestos. La ausencia de unión adicional indica que los dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a epítopos superpuestos. También pueden emplearse varios métodos adicionales, que incluyen ELISA, cromatografía de exclusión por tamaño, cristalografía, HDX-MS, mutagénesis y otros métodos de SPR, para demostrar que dos anticuerpos se unen al mismo epítipo o a epítopos superpuestos. Pueden utilizarse técnicas similares para determinar si un anticuerpo bloquea de forma cruzada al anticuerpo de la invención, o se ve bloqueado por este.

## 2. Ensayos de actividad

En un aspecto, se proporcionan ensayos para identificar anticuerpos contra triptasa de estos con actividad biológica. La actividad biológica puede incluir, por ejemplo, la unión a triptasa (por ejemplo, triptasa en el torrente sanguíneo o en las vías aéreas) o un fragmento peptídico de esta, ya sea *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En otras modalidades, la actividad biológica puede incluir el bloqueo o neutralización de triptasa. Por ejemplo, en algunas modalidades, la actividad biológica puede incluir bloquear o neutralizar la actividad proteolítica de la triptasa. También se proporcionan anticuerpos que tienen tal actividad biológica *in vivo* y/o *in vitro*. En determinadas modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para determinar dicha actividad biológica.

Por ejemplo, en algunas modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar la inhibición de la actividad de triptasa en un ensayo enzimático de triptasa, por ejemplo, mediante el uso de un sustrato peptídico (por ejemplo, péptido sintético S-2288), por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos (por ejemplo, Ejemplo 1, particularmente el apartado (A)(viii)(a)), o mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Fukuoka et ál. *J. Immunol.* 176:3165-3172, 2006). En algunas modalidades, la inhibición de la actividad de triptasa en un ensayo enzimático de triptasa se lleva a cabo a pH neutro o alrededor de

este (por ejemplo, alrededor de pH 7, por ejemplo, alrededor de pH 7, alrededor de pH 7.4 o alrededor de pH 8). En otras modalidades, la inhibición de la actividad de triptasa en un ensayo enzimático de triptasa se lleva a cabo a pH ácido (por ejemplo, alrededor de pH 6.0, por ejemplo, alrededor de pH 4.0, alrededor de pH 5.0, alrededor de pH 6.0 o alrededor de pH 6.5).

En otras modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar su capacidad de alterar la triptasa con una estructura tetramérica (tal como la triptasa madura presente en gránulos secretorios de mastocitos o liberada de estos) para formar monómeros, lo que puede determinarse mediante el uso de cualquiera método adecuado conocido en la técnica, que incluye cromatografía de filtración de gel (por ejemplo, cromatografía de filtración de gel SUPEROSE® 12). Ver, por ejemplo, Fukuoka et ál. *J. Immunol.* 176:3165-3172, 2006.

En aun otras modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar la capacidad de inhibir la contracción y/o proliferación estimulada por triptasa de las células del musculo liso de las vías aéreas humanas, según se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

En incluso otras modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar la capacidad de inhibir la desgranulación de mastocitos y/o liberación de histamina, por ejemplo, estimulada por triptasa y/o IgE. Dichos ensayos se describen, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

En algunas modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar la capacidad de inhibir la triptasa activa, por ejemplo, en un ensayo de triptasa activa (ver, por ejemplo, Figura 15 y Ejemplo 6), por ejemplo, en una muestra (por ejemplo, líquido de lavado broncoalveolar) obtenida de un sujeto tras la administración del anticuerpo al sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa o subcutánea).

En otras modalidades, un anticuerpo de la invención se evalúa para detectar la capacidad de modular (por ejemplo, aumentar o disminuir) los niveles de triptasa total, por ejemplo, en un ensayo de triptasa total (ver, por ejemplo, Figura 15 y Ejemplo 6), por ejemplo, en una muestra (por ejemplo, líquido de lavado broncoalveolar) obtenida de un sujeto tras la

administración del anticuerpo al sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa o subcutánea).

#### *D. Inmunoconjugados*

5

La invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo contra triptasa conjugado en la presente con uno o más agentes citotóxicos, tales como agentes o fármacos quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, toxinas (por ejemplo, toxinas de proteínas, toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de estas) o isótopos radiactivos.

10

En una modalidad, un inmunoconjugado es un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) donde un anticuerpo se conjuga con uno o más fármacos, incluso, de modo no taxativo, un maitansinoide (ver las patentes estadounidenses n.º 5,208,020, 5,416,064 y la patente europea EP 0 425 235 B1); una auristatina tal como restos de fármaco monometilauristatina DE y DF (MMAE y MMAF) (ver las patentes estadounidenses n.º 5,635,483, 5,780,588 y 7,498,298); una dolastatina; una caliqueamicina o derivado de esta (ver las patentes estadounidenses n.º 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001 y 5,877,296; Hinman et ál. *Cancer Res.* 53:3336-3342, 1993; y Lode et ál. *Cancer Res.* 58:2925-2928, 1998), una antraciclina tal como daunomicina o doxorubicina (ver Kratz et ál. *Current Med. Chem.* 13:477-523, 2006; Jeffrey et ál. *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362, 2006; Torgov et ál. *Bioconj. Chem.* 16:717-721, 2005; Nagy et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834, 2000; Dubowchik et ál. *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, 2002; King et ál. *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, 2002; y la patente estadounidense n.º 6,630,579); metotrexato; vindesina; un taxano tal como docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel y ortataxel; un tricoteceno; y CC1065.

15

20

25

30

En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo descrito en la presente conjugado con una toxina enzimáticamente activa o un fragmento de esta, que incluye, de modo no taxativo, cadena A de difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A

de abrina, cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas diantina, proteínas *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidores de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y tricotecenos.

5

En otra modalidad, un inmunoconjugado comprende un anticuerpo descrito en la presente conjugado con un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Se encuentra a disposición una variedad de isótopos radiactivos para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen  $At^{211}$ ,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$ ,  $Re^{186}$ ,  $Re^{188}$ ,  $Sm^{153}$ ,  $Bi^{212}$ ,  $P^{32}$ ,  $Pb^{212}$  e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se utiliza el radioconjugado para la detección, este puede comprender un átomo radiactivo para estudios centellográficos, por ejemplo, tecnecio-99m (tc99m) o  $I^{123}$ , o un marcador de espín para imágenes de resonancia magnética nuclear (NMR) (también conocida como imagenología por resonancia magnética o IRM), tal como yodo 123, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro.

15

Los conjugados de un anticuerpo y agente citotóxico pueden realizarse mediante el uso de una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), ciclohexan-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (como bis (p-azidobenzoil)hexandiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et ál. *Science* 238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminapentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Ver WO 94/11026. El enlazador puede ser un “enlazador escindible” que facilita la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador de dimetilo o enlazador que contiene disulfuro

25

30

(ver, por ejemplo, Chari et ál. *Cancer Res.* 52:127-131, 1992; patente estadounidense n.º 5,208,020).

Los inmunoconjugados o ADC en la presente contemplan expresamente, pero no se limitan a dichos conjugados preparados con reactivos de reticulación, de modo no taxativo, 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 y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que se encuentran comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., EUA).

#### *E. Métodos y composiciones para el diagnóstico y la detección*

En determinadas modalidades, cualquiera de los anticuerpos contra triptasa proporcionados en la presente es útil para detectar la presencia de triptasa en una muestra biológica. Tal como se usa en la presente, el término “detectar” abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas modalidades, una muestra biológica comprende una célula o tejido, que incluye, de modo no taxativo, mastocitos, basófilos, células epiteliales o tejido pulmonar (por ejemplo, músculo liso bronquial). En determinadas modalidades, una muestra biológica comprende sangre (por ejemplo, sangre completa, suero o plasma), esputo, lavado broncoalveolar o una muestra nasal.

En una modalidad, se proporciona un anticuerpo contra triptasa para su uso en un método de diagnóstico o detección. En un aspecto adicional, se proporciona un método para detectar la presencia de triptasa en una muestra biológica. En determinadas modalidades, el método comprende poner en contacto a la muestra biológica con un anticuerpo contra triptasa tal como se describe en la presente, en condiciones que permitan la unión del anticuerpo contra triptasa a la triptasa, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo contra triptasa y la triptasa. Dicho método puede ser un método *in vitro* o *in vivo*. En una modalidad, se usa un anticuerpo contra triptasa para seleccionar sujetos que son susceptibles a la terapia con anticuerpo contra triptasa, por ejemplo, donde la triptasa es un biomarcador para la selección de pacientes.

Los ejemplos de trastornos que pueden diagnosticarse mediante el uso de un anticuerpo de la invención incluyen trastornos pulmonares (por ejemplo, asma (por ejemplo, asma de Th2 elevado o asma de Th2 bajo), hipersensibilidad de las vías aéreas o EPOC), trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, IBD y enfermedad de Crohn), trastornos inflamatorios (por ejemplo, urticaria idiopática crónica (CIU o CSU), dermatitis atópica o rinitis alérgica), trastornos fibróticos (por ejemplo, IPF), trastornos granulocíticos (neutrófilicos o eosinofílicos), trastornos monocíticos, trastornos linfocíticos, trastornos asociados con mayores cantidades o distribución de células residentes en tejidos normales o anómalas (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de músculo liso, epitelios o endotelios, y trastornos asociados con triptasa o trastornos mediados por triptasa.

Por ejemplo, en algunas instancias, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para diagnosticar o detectar anafilaxis (por ejemplo, anafilaxis sistémica grave) o mastocitosis (por ejemplo, mastocitosis sistémica no grave), por ejemplo, según se describe en Schwartz et ál. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.* 26:451-463, 2006). Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse, por ejemplo, en un ELISA para detectar los niveles de triptasa total, protriptasa y/o triptasa madura. En algunas modalidades, un anticuerpo de la invención puede utilizarse como anticuerpo de captura en un ELISA. En otras modalidades, un anticuerpo de la invención puede utilizarse como anticuerpo de detección en un ELISA. En modalidades particulares, un nivel de referencia normal de triptasa total en suero o plasma puede ser de alrededor de 1-15 ng/mL (por ejemplo, alrededor de 1 ng/mL, alrededor de 2 ng/mL, alrededor de 3 ng/mL, alrededor de 4 ng/mL, alrededor de 5 ng/mL, alrededor de 6 ng/mL, alrededor de 7 ng/mL, alrededor de 8 ng/mL, alrededor de 9 ng/mL, alrededor de 10 ng/mL, alrededor de 11 ng/mL, alrededor de 12 ng/mL, alrededor de 13 ng/mL, alrededor de 14 ng/mL o alrededor de 15 ng/mL). En algunas instancias, un aumento con respecto a un nivel de referencia normal de triptasa total se utiliza como indicador de diagnóstico de un trastorno asociado con triptasa. En algunas modalidades, un nivel de referencia normal de triptasa madura en suero o plasma puede ser <1 ng/mL. En algunas modalidades, un aumento con respecto a un nivel de referencia normal de triptasa madura puede utilizarse como indicador de diagnóstico de un

trastorno asociado con triptasa.

En determinadas modalidades, se proporcionan anticuerpos contra triptasa marcados. Los marcadores incluyen, de modo no taxativo, marcadores o restos que se detectan de forma directa (tales como marcadores fluorescentes, cromofóricos, electrodensos, quimioluminiscentes y radiactivos), así como restos, tales como enzimas o ligandos, que se detectan de forma indirecta, por ejemplo, a través de una reacción enzimática o interacción molecular. Los ejemplos de etiquetas incluyen, de modo no taxativo, los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ , fluoróforos tales como quelatos térreos poco comunes o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente estadounidense n.º 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacáridas, por ejemplo, oxidasa de glucosa, oxidasa de galactosa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tal como uricasa y oxidasa xantina, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de salto, etiquetas bacteriófagas, radicales libres estables y similares.

#### F. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de un anticuerpo contra triptasa de la invención se preparan mediante la mezcla de dicho anticuerpo que posee el grado deseado de pureza con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's *Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. En general, los portadores farmacéuticamente aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen, de modo no taxativo: amortiguadores tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso

molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no-iónicos tales como polietilenglicol (PEG). Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables de la presente incluyen además agentes de dispersión de fármacos intersticiales tales como glicoproteínas hialuronidasa activa neutral soluble (sHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas hialuronidasa PH-20 humanas solubles, tales como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Determinados ejemplos de sHASEGP y métodos de uso, que incluyen rHuPH20, se describen en las patentes estadounidenses n.º 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, una sHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Se describen ejemplos de formulaciones liofilizadas de anticuerpos en la patente estadounidense n.º 6,267,958. Las formulaciones de anticuerpos acuosas incluyen las descritas en las patentes estadounidenses n.º 6,171,586 y WO 2006/044908, e incluyen una solución amortiguadora de histidina y acetato.

La formulación de la presente también puede contener más de un ingrediente activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma negativa entre sí. Por ejemplo, puede desearse proporcionar además un antagonista de unión a interleucina-13 (IL-13), un antagonista de unión al eje de interleucina-17 (IL-17), un antagonista de unión al eje de interleucina-5 (IL-5), un antagonista de unión al eje de IL-33, un antagonista principal de M1, un antagonista de IgE, un antagonista de TRPA1, un antagonista de CRTH2, un broncodilatador o medicamento para el control de los síntomas del asma, un inmunomodulador, un corticosteroide, un inhibidor de la vía Th2, un inhibidor de tirosina cinasa o un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje IL-13 es un anticuerpo contra IL-13, por ejemplo, lebrikizumab. En algunas modalidades, el

antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, un antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33. En algunas instancias, el antagonista principal de M1 es quilizumab. En algunas instancias, el antagonista de IgE es omalizumab (XOLAIR®). Dichos ingredientes activos se encuentran presentes adecuadamente en una combinación en cantidades que son eficaces para los fines deseados.

Los ingredientes activos pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de liberación de fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16.<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed., 1980.

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo y que se encuentran en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas.

En general, las formulaciones que pueden utilizarse en administración *in vivo* son estériles. La esterilización se logra fácilmente, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen antioxidantes. Dichas composiciones pueden utilizarse para reducir la oxidación de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa, tal como hu31A.v11). En algunas instancias, se incluye un antioxidante para reducir la oxidación de un residuo de triptófano, por ejemplo, un residuo de triptófano en una región HVR o una región FR de una región variable. En casos particulares, se incluye un antioxidante para reducir la oxidación de un residuo HVR-

H3 de un anticuerpo contra triptasa, por ejemplo, W100 en hu31A.v11. En algunas instancias, se incluye un antioxidante en la composición para reducir la oxidación de un residuo de metionina, por ejemplo, un residuo de metionina en la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo contra triptasa), tal como los residuos de Fc M251, M357 y/o M427 (por ejemplo, de hu31A.v11).

En algunas instancias, la composición farmacéutica incluye cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente y un antioxidante. En algunas instancias, el anticuerpo es susceptible a oxidación (por ejemplo, en uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) residuos de triptófano o metionina). Puede utilizarse cualquier antioxidante adecuado. Por ejemplo, en algunas instancias, la composición incluye uno o más antioxidantes (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 antioxidantes) que se seleccionan del grupo que consiste en N-acetilriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano), triptófano, metionina (por ejemplo, L-metionina), cisteína, glutatión, tiosorbitol, ácido ascórbico, monotioglicerol, ciclodextrinas, Trolox, piridoxina, polioles (por ejemplo, manitol), sacarosa, un quelante metálico (por ejemplo, EDTA) y combinaciones de estos (por ejemplo, una combinación de N-acetilriptófano y metionina). En algunas instancias, el antioxidante es N-acetilriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano). En otras instancias, el antioxidante es metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina). En casos particulares, la composición incluye N-acetilriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano) y metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina). En algunas instancias, el N-acetilriptófano reduce o previene la oxidación de triptófano en el anticuerpo. En algunas instancias, la metionina reduce o previene la oxidación de metionina en el anticuerpo.

La composición farmacéutica puede incluir cualquier concentración adecuada del antioxidante con el fin de reducir o eliminar la oxidación. Por ejemplo, la concentración de polioles (por ejemplo, manitol) o sacarosa puede ser de alrededor de 1 % (p/v) a alrededor de 25 % (p/v), por ejemplo, alrededor de 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 3 %, alrededor de 4 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 7 %, alrededor de 8 %, alrededor de 9 %, alrededor de 10 %, alrededor de 11 %, alrededor de 12 %, alrededor de 13 %, alrededor de 15 %, alrededor de 16 %, alrededor de 17 %, alrededor de 18 %, alrededor de 19 %, alrededor

de 20 % o alrededor de 25 % (p/v). En casos particulares, la concentración de polioles (por ejemplo, manitol) o sacarosa puede ser de alrededor de 15 % (p/v). En otro ejemplo, la concentración de quelantes metálicos (por ejemplo, EDTA) puede ser de alrededor de 0.01 % (p/v) a alrededor de 1 % (p/v), por ejemplo, alrededor de 0.01 %, alrededor de 0.02 %, alrededor de 0.03 %, alrededor de 0.04 %, alrededor de 0.05 %, alrededor de 0.06 %, alrededor de 0.07 %, alrededor de 0.08 %, alrededor de 0.09 %, alrededor de 0.1 %, alrededor de 0.15 %, alrededor de 0.2 %, alrededor de 0.25 %, alrededor de 0.3 %, alrededor de 0.4 %, alrededor de 0.45 %, alrededor de 0.5 %, alrededor de 0.6 %, alrededor de 0.7 %, alrededor de 0.8 %, alrededor de 0.9 % o alrededor de 1 % (p/v). En casos particulares, la concentración de un quelante metálico (por ejemplo, EDTA) puede ser de alrededor de 0.4 % (p/v). En aun otro ejemplo, la concentración de metionina y/o triptófano puede ser de alrededor de 0.1 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml, por ejemplo, alrededor de 0.1 mg/ml, alrededor de 0.5 mg/ml, alrededor de 1 mg/ml, alrededor de 2 mg/ml, alrededor de 3 mg/ml, alrededor de 4 mg/ml, alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 6 mg/ml, alrededor de 7 mg/ml, alrededor de 8 mg/ml, alrededor de 9 mg/ml o alrededor de 10 mg/ml. En algunas instancias, la concentración de metionina y/o triptófano es de alrededor de 2 mg/ml.

Por ejemplo, en algunas instancias, la invención proporciona una composición farmacéutica que incluye:

- (i) un anticuerpo aislado que se une a la triptasa humana, o un fragmento de unión al antígeno de esta, donde el anticuerpo comprende las siguientes seis regiones hipervariables (HVR): (a) una HVR-H1 que comprende la secuencia de aminoácidos DYGMV (SEQ ID NO: 7); (b) una HVR-H2 que comprende la secuencia de aminoácidos FISSGSSTVYYADTMKG (SEQ ID NO: 2); (c) una HVR-H3 que comprende la secuencia de aminoácidos RNYDDWYFDV (SEQ ID NO: 8); (d) una HVR-L1 que comprende la secuencia de aminoácidos SASSSVTYMY (SEQ ID NO: 4); (e) una HVR-L2 que comprende la secuencia de aminoácidos RTSDLAS (SEQ ID NO: 5); y (f) una HVR-L3 que comprende la secuencia de aminoácidos QHYHSYPLT (SEQ ID NO: 6); (ii) N-acetilriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano); y (iii) metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina).

Puede utilizarse en cualquiera de las composiciones descritas en la presente cualquier

concentración adecuada de N-acetiltriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano). En algunas instancias, la concentración de N-acetiltriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-triptófano) es de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 20 mM (por ejemplo, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0.05 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.9 mM, de alrededor de 0.1 a alrededor de 0.8 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.7 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.6 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.5 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.4 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 0.3 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 0.2 mM

a alrededor de 16 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 10 mM, de  
5 alrededor de 0.2 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 2 mM, de  
10 alrededor de 0.2 a alrededor de 0.8 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 0.7 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 0.6 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 0.5 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 0.4 mM, de alrededor de 0.2 mM a alrededor de 0.3 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 0.3 mM a  
15 alrededor de 15 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 0.9 mM, de alrededor de 0.3 a alrededor de 0.8 mM, de alrededor de  
20 0.3 mM a alrededor de 0.7 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 0.6 mM, de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 0.5 mM o de alrededor de 0.3 mM a alrededor de 0.4 mM). En algunas instancias, el N-acetiltriptófano se encuentra a una concentración de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 1 mM (por ejemplo, alrededor de 0.1 mM, alrededor de 0.2 mM, alrededor de 0.3 mM, alrededor de 0.4 mM, alrededor de 0.5 mM, alrededor de 0.6 mM, alrededor de 0.7 mM, alrededor de 0.8 mM, alrededor de 0.9 mM o alrededor de 1 mM). En casos particulares,  
25 la concentración de N-acetiltriptófano (por ejemplo, N-acetil DL-triptófano o N-acetil D-

triptófano) es de alrededor de 0.3 mM. En casos particular, el N-acetiltriptófano es N-acetil DL-triptófano.

Puede utilizarse en cualquiera de las composiciones descritas en la presente cualquier

5 concentración adecuada de metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina). Por ejemplo, en algunas instancias, la concentración de metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina) es de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 30 mM (por ejemplo, de alrededor de 0.1 mM a

10 alrededor de 30 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 25 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 13 mM, de

15 alrededor de 0.1 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0.1 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 20

20 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 7 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 5 mM, de

25 alrededor de 1 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 3 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 2 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 20 mM, de

30 alrededor de 2 mM a alrededor de 19 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 17 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 16 mM, de

alrededor de 2 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 14 mM, de  
 alrededor de 2 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 13 mM, de  
 alrededor de 2 mM a alrededor de 12 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 11 mM, de  
 alrededor de 2 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 9 mM, de  
 5 alrededor de 2 mM a alrededor de 8 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 7 mM, de  
 alrededor de 2 mM a alrededor de 6 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 5 mM, de  
 alrededor de 2 mM a alrededor de 4 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 3 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 20 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 19 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 18 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 17 mM, de  
 10 alrededor de 5 mM a alrededor de 16 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 15 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 14 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 13 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 13 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 12 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 11 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 10 mM, de  
 alrededor de 5 mM a alrededor de 9 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 8 mM, de  
 15 alrededor de 5 mM a alrededor de 7 mM o de alrededor de 5 mM a alrededor de 6 mM). En  
 algunas instancias, la metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina) se encuentra  
 presente a una concentración de alrededor de 1 mM a alrededor de 10 mM (por ejemplo,  
 alrededor de 1 mM, alrededor de 2 mM, alrededor de 3 mM, alrededor de 4 mM, alrededor de  
 5 mM, alrededor de 6 mM, alrededor de 7 mM, alrededor de 8 mM, alrededor de 9 mM o  
 20 alrededor de 10 mM). En casos particulares, la concentración de metionina (por ejemplo, L-  
 metionina o D-metionina) es de alrededor de 5 mM. En otros casos, la concentración de  
 metionina es de alrededor de 10 mM. En casos particulares, la metionina es L-metionina.

En algunas instancias, la presencia del antioxidante (por ejemplo, N-acetiltriptófano (por  
 25 ejemplo, N-acetil DL-triptófano) y/o metionina (por ejemplo, L-metionina o D-metionina))  
 reduce el porcentaje de oxidación del anticuerpo contra triptasa en un residuo particular (por  
 ejemplo, un residuo de triptófano o un residuo de metionina, por ejemplo, en un residuo de  
 HVR-H3 (por ejemplo, W100 del dominio VH de hu31A.v11) o en un residuo de Fc (por  
 ejemplo, los residuos de Fc M251, M357 y/o M427 (por ejemplo, de hu31A.v11)) alrededor de  
 30 1 %, alrededor de 2 %, alrededor de 5 %, alrededor de 6 %, alrededor de 10 %, alrededor de  
 15 %, alrededor de 20 %, alrededor de 25 %, alrededor de 28 %, alrededor de 30 %, alrededor

de 35 %, alrededor de 40 %, alrededor de 45 %, alrededor de 50 %, alrededor de 55 %, alrededor de 60 %, alrededor de 65 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más, por ejemplo, con respecto al porcentaje de oxidación en el residuo en ausencia del antioxidante.

En casos en los que el anticuerpo incluye un residuo W100 del dominio VH en HVR-H3 (por ejemplo, hu31A.v11) que es susceptible a oxidación, en algunas instancias, el residuo W100 del dominio VH en HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 35 % (por ejemplo, menor que 35 %, menor que 34 %, menor que 33 %, menor que 32 %, menor que 31 %, menor que 30 %, menor que 29 %, menor que 28 %, menor que 27 %, menor que 26 %, menor que 25 %, menor que 24 %, menor que 23 %, menor que 22 %, menor que 21 %, menor que 20 %, menor que 19 %, menor que 18 %, menor que 17 %, menor que 16 %, menor que 15 %, menor que 14 %, menor que 13 %, menor que 12 %, menor que 11 %, menor que 10 %, menor que 9 %, menor que 8 %, menor que 7 %, menor que 6 %, menor que 5 %, menor que 4 %, menor que 3 %, menor que 2 %, menor que 1 % o menor). Por ejemplo, en algunas instancias, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 35 %. En otros casos, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 25 %. En aun otros casos, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 15 %. En incluso otros casos, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 10 %. En otros casos, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 5 %. En otros casos, el residuo W100 de HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación menor que alrededor de 4 %, alrededor de 3 %, alrededor de 2 % o alrededor de 1 %.

A modo de ejemplo, en algunos casos en los que el anticuerpo incluye un residuo W100 del dominio VH en HVR-H3 que es susceptible a oxidación, en algunas instancias, el residuo W100 del dominio VH en HVR-H3 posee un porcentaje de oxidación de alrededor de 1 % a  
alrededor de 50 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 45 %, de alrededor de 1 % a alrededor  
de 40 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 35 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 30 %, de

de alrededor de 1 % a alrededor de 25 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 20 %, de  
 alrededor de 1 % a alrededor de 15 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 10 %, de alrededor  
 de 1 % a alrededor de 5 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 4 %, de alrededor de 1 % a  
 alrededor de 3 %, de alrededor de 1 % a alrededor de 2 %, de alrededor de 5 % a alrededor  
 5 de 50 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 45 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 50 %,  
 de alrededor de 5 % a alrededor de 35 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 30 %, de  
 alrededor de 5 % a alrededor de 25 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 20 %, de alrededor  
 de 5 % a alrededor de 15 %, de alrededor de 5 % a alrededor de 10 %, de alrededor de 10 %  
 a alrededor de 50 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 45 %, de alrededor de 10 % a  
 10 alrededor de 40 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 35 %, de alrededor de 10 % a  
 alrededor de 30 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 25 %, de alrededor de 10 % a  
 alrededor de 20 %, de alrededor de 10 % a alrededor de 15 %, de alrededor de 15 % a  
 alrededor de 50 %, de alrededor de 15 % a alrededor de 45 %, de alrededor de 15 % a  
 alrededor de 40 %, de alrededor de 15 % a alrededor de 35 %, de alrededor de 15 % a  
 15 alrededor de 30 %, de alrededor de 15 % a alrededor de 25 %, de alrededor de 15 % a  
 alrededor de 20 %, de alrededor de 25 % a alrededor de 50 % o de alrededor de 30 % a  
 alrededor de 50 %.

El porcentaje de oxidación puede determinarse, por ejemplo, alrededor de 1 mes, 2 meses, 3  
 20 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12  
 meses, 18 meses, dos años o más a partir de la producción inicial de un anticuerpo o  
 composición farmacéutica de este. En algunas instancias, el porcentaje de oxidación se  
 determina a alrededor de 9 meses, alrededor de 12 meses, alrededor de 18 meses o dos años  
 a partir de la producción inicial de un anticuerpo o composición farmacéutica de este.

25

La concentración de un anticuerpo en una composición de la invención, por ejemplo, puede  
 encontrarse en el intervalo de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL (por ejemplo,  
 de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de  
 325 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a  
 30 alrededor de 275 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, de alrededor  
 de 1 mg/mL a alrededor de 225 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL,

de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 125 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 50 mg/mL, de alrededor de 1 mg/mL a alrededor de 25 mg/mL, de  
5 alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 325 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 275 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 225 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL  
10 a alrededor de 150 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 125 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL, de alrededor de 25 mg/mL a alrededor de 50 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 325 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 275  
15 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 225 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 125 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL, de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 75 mg/mL, de alrededor  
20 de 75 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 325 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 275 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 225 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a  
25 alrededor de 150 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 125 mg/mL, de alrededor de 75 mg/mL a alrededor de 100 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 350 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 325 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 300 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 275 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 250 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 225  
30 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL, de alrededor de 100 mg/mL a alrededor de 150 mg/mL, de alrededor

de 100 mg/mL a alrededor de 125 mg/mL o de alrededor de 150 mg/mL a alrededor de 175 mg/mL. En algunas instancias, el anticuerpo se encuentra presente a una concentración de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL (por ejemplo, alrededor de 50 mg/mL, alrededor de 60 mg/mL, alrededor de 70 mg/mL, alrededor de 80 mg/mL, alrededor de 90 mg/mL, alrededor de 100 mg/mL, alrededor de 110 mg/mL, alrededor de 120 mg/mL, alrededor de 130 mg/mL, alrededor de 140 mg/mL, alrededor de 150 mg/mL, alrededor de 160 mg/mL, alrededor de 170 mg/mL, alrededor de 180 mg/mL, alrededor de 190 mg/mL o alrededor de 200 mg/mL. En casos particulares, la concentración del anticuerpo es de alrededor de 150 mg/mL.

10

Cualquiera de las composiciones descritas en la presente puede incluir uno o más excipientes adicionales que se seleccionan del grupo que consiste en un estabilizante, un amortiguador, un tensioactivo y un agente de tonicidad. En algunas instancias, el amortiguador comprende succinato de arginina y/o succinato de histidina. En algunas instancias, el amortiguador incluye succinato de arginina y succinato de histidina.

15

Puede utilizarse cualquier concentración adecuada de succinato de arginina. Por ejemplo, en algunas instancias, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 10 mM a alrededor de 500 mM (por ejemplo, alrededor de 10 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 30 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 50 mM, alrededor de 75 mM, alrededor de 100 mM, alrededor de 125 mM, alrededor de 150 mM, alrededor de 175 mM, alrededor de 200 mM, alrededor de 225 mM, alrededor de 250 mM, alrededor de 275 mM, alrededor de 300 mM, alrededor de 325 mM, alrededor de 350 mM, alrededor de 375 mM, alrededor de 400 mM, alrededor de 425 mM, alrededor de 450 mM, alrededor de 475 mM o alrededor de 500 mM).

20

Por ejemplo, en algunas instancias, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 100 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 125 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 150 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 175 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 200 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 225 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 250 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 275 mM a alrededor de 300 mM, de alrededor de 100 mM a alrededor de 250 mM, de alrededor de 125 mM a alrededor de 250 mM, de alrededor de 150 mM a alrededor de 250 mM, de alrededor de

25

30

175 mM a alrededor de 250 mM, de alrededor de 200 mM a alrededor de 250 mM, de  
alrededor de 100 mM a alrededor de 225 mM, de alrededor de 125 mM a alrededor de 225  
mM, de alrededor de 150 mM a alrededor de 225 mM, de alrededor de 175 mM a alrededor de  
225 mM, de alrededor de 200 mM a alrededor de 225 mM, de alrededor de 100 mM a  
5 alrededor de 200 mM, de alrededor de 125 mM a alrededor de 200 mM, de alrededor de 150  
mM a alrededor de 200 mM o de alrededor de 175 mM a alrededor de 200 mM. En casos  
particulares, la concentración de succinato de arginina es de alrededor de 200 mM.

Puede utilizarse cualquier concentración adecuada de succinato de histidina. Por ejemplo, en  
10 algunas modalidades, la concentración de succinato de histidina es de alrededor de 1 mM a  
alrededor de 100 mM (por ejemplo, alrededor de 1 mM, alrededor de 5 mM, alrededor de 10  
mM, alrededor de 15 mM, alrededor de 20 mM, alrededor de 25 mM, alrededor de 30 mM,  
alrededor de 35 mM, alrededor de 40 mM, alrededor de 45 mM, alrededor de 50 mM,  
alrededor de 55 mM, alrededor de 60 mM, alrededor de 65 mM, alrededor de 70 mM,  
15 alrededor de 75 mM, alrededor de 80 mM, alrededor de 85 mM, alrededor de 90 mM,  
alrededor de 95 mM o alrededor de 100 mM). En casos particulares, la concentración de  
succinato de histidina es de alrededor de 20 mM.

Cualquiera de las composiciones descritas en la presente puede tener un pH de alrededor de  
20 4.0 a alrededor de 7.0 (por ejemplo, alrededor de 4.0, alrededor de 4.5, alrededor de 5.0,  
alrededor de 5.5, alrededor de 6.0, alrededor de 6.5 o alrededor de 7.0). En algunas  
instancias, el pH es de alrededor de 4.5 a alrededor de 7.0 (por ejemplo, alrededor de 4.5,  
alrededor de 5.0, alrededor de 5.5, alrededor de 6.0, alrededor de 6.5 o alrededor de 7.0). En  
algunas instancias, el pH es de alrededor de 4.5 a alrededor de 6.5 (por ejemplo, alrededor de  
25 4.5, alrededor de 4.6, alrededor de 4.7, alrededor de 4.8, alrededor de 4.9, alrededor de 5,  
alrededor de 5.1, alrededor de 5.2, alrededor de 5.3, alrededor de 5.4, alrededor de 5.5  
alrededor de 5.6, alrededor de 5.7, alrededor de 5.8, alrededor de 5.9, alrededor de 6,  
alrededor de 6.1, alrededor de 6.2, alrededor de 6.3, alrededor de 6.4 o alrededor de 6.5). En  
algunas instancias, el pH es de alrededor de 5.0 a alrededor de 6.0 (por ejemplo, alrededor de  
30 5.0, alrededor de 5.1, alrededor de 5.2, alrededor de 5.3, alrededor de 5.4, alrededor de 5.5,  
alrededor de 5.6, alrededor de 5.7, alrededor de 5.8, alrededor de 5.9 o alrededor de 6.0). En

algunas instancias, el pH es de alrededor de 5.5.

Puede utilizarse cualquier tensioactivo adecuado en las composiciones descritas en la presente. En algunas instancias, el tensioactivo es poloxámero 188 o polisorbato 20. Puede utilizarse cualquier concentración adecuada de poloxámero 188. Por ejemplo, la concentración de poloxámero 188 puede ser de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.5 %, de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.05 % o alrededor de 0.02 %. En algunas instancias, la concentración de poloxámero 188 es alrededor de 0.01 %, alrededor de 0.02 %, alrededor de 0.03 %, alrededor de 0.04 %, alrededor de 0.05 %, alrededor de 0.06 %, alrededor de 0.07 %, alrededor de 0.08 %, alrededor de 0.09 % o alrededor de 0.1 %. En modalidades particulares, la concentración de poloxámero 188 es de alrededor de 0.02 %. Puede utilizarse cualquier concentración adecuada de polisorbato 20. Por ejemplo, la concentración de polisorbato 20 puede ser de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.5 %, de alrededor de 0.005 % a alrededor de 0.05 % o alrededor de 0.02 %. En algunas instancias, la concentración de polisorbato 20 es alrededor de 0.01 %, alrededor de 0.02 %, alrededor de 0.03 %, alrededor de 0.04 %, alrededor de 0.05 %, alrededor de 0.06 %, alrededor de 0.07 %, alrededor de 0.08 %, alrededor de 0.09 % o alrededor de 0.1 %.

En casos particulares, la composición incluye alrededor de 150 mg/mL de un anticuerpo contra triptasa descrito en la presente (por ejemplo, hu31A.v11), alrededor de 200 mM de succinato de arginina, alrededor de 20 mM de succinato de histidina, alrededor de 0.3 mM de N-acetil DL-triptófano), alrededor de 5 mM de L-metionina, alrededor de 0.02 % poloxámero 188 y un pH de alrededor de 5.8.

Cualquiera de las composiciones descritas en la presente puede formularse para administración a través de cualquier vía adecuada. En casos particulares, la composición se formula para administración subcutánea o administración intravenosa. En algunas instancias, la composición se formula para la administración subcutánea.

*G. Composiciones y métodos terapéuticos*

Cualquiera de los anticuerpos contra triptasa o composiciones farmacéuticas de la invención puede utilizarse en métodos terapéuticos.

En un aspecto, se proporciona un anticuerpo contra triptasa o una composición farmacéutica de este para su uso como medicamento. En aspectos adicionales, se proporciona un anticuerpo contra triptasa o una composición farmacéutica de este para su uso en el tratamiento de un trastorno. En determinadas modalidades, se proporciona un anticuerpo contra triptasa o una composición farmacéutica de este para su uso en un método de tratamiento. En determinadas modalidades, la invención proporciona un anticuerpo contra triptasa, o una composición farmacéutica de este, para su uso en un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno que implica administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo contra triptasa. En algunas modalidades, el método incluye además administrarle al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe a continuación. Un “sujeto” de acuerdo con cualquiera de las modalidades anteriores es preferentemente un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un anticuerpo contra triptasa o composición farmacéutica de este en la fabricación o preparación de un medicamento. En una modalidad, el medicamento es para el tratamiento de un trastorno. En una modalidad adicional, el medicamento es para su uso en un método para tratar un trastorno, que comprende administrarle a un sujeto que padece el trastorno una cantidad eficaz del medicamento. En una de dichas modalidades, el método comprende además administrarle al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante. Un “sujeto” de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno que incluye, por ejemplo, un trastorno pulmonar (por ejemplo, asma (por ejemplo, asma de Th2 elevado o asma de Th2 bajo), hipersensibilidad de las vías aéreas o EPOC), un trastorno autoinmunitario (por ejemplo, artritis reumatoide, psoriasis, esofagitis eosinofílica, IBD y enfermedad de Crohn), un trastorno inflamatorio (por ejemplo, urticaria idiopática

crónica (CIU o CSU), anafilaxis, dermatitis atópica o rinitis alérgica), un trastorno fibrótico (por ejemplo, IPF), un trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico, un trastorno asociado con mayores cantidades o distribución de células residentes en tejidos normales o anómalas (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de músculo liso, epitelios o endotelios, y un trastorno asociado con triptasa o un trastorno mediado por triptasa. En una modalidad, el método comprende administrarle a un sujeto que padece un trastorno una cantidad eficaz de un anticuerpo contra triptasa o una composición farmacéutica de este. En una de estas modalidades, el método comprende además administrarle al sujeto una cantidad eficaz de al menos un agente terapéutico adicional, como se describe más adelante. Un “sujeto” de acuerdo con cualquiera de las modalidades que anteceden puede ser un ser humano.

En un aspecto adicional, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los anticuerpos contra triptasa proporcionados en la presente, por ejemplo, para su uso en los métodos terapéuticos antemencionados. En una modalidad, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos contra triptasa proporcionados en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra modalidad, una formulación farmacéutica comprende cualquiera de los anticuerpos contra triptasa proporcionados en la presente y al menos un agente terapéutico adicional, por ejemplo, como se describe más adelante. Puede utilizarse cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en el apartado F que antecede (por ejemplo, aquellas que incluyen un antioxidante tal como N-acetiltriptófano y/o metionina) en cualquiera de los usos o métodos descritos en la presente.

En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno autoinmunitario, un trastorno inflamatorio, un trastorno fibrótico, un trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), un trastorno monocítico, un trastorno linfocítico o un trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de tejido liso, epitelios o endotelios). En algunas modalidades, el trastorno es un trastorno

pulmonar.

En algunas modalidades, el trastorno pulmonar se asocia con inflamación pulmonar granulocítica (eosinofílica y/o neutrofílica), afecciones pulmonares inducidas por infecciones (que incluyen las asociadas con desencadenantes virales (por ejemplo, influenza, parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus humano y virus sincitial respiratorio), bacterianos o fúngicos (por ejemplo, *Aspergillus*). En algunas modalidades, el trastorno es una afección pulmonar inducida por alérgenos, una afección pulmonar inducida por contaminantes ambientales tóxicos (por ejemplo, asbestosis, silicosis o beriliosis), una afección pulmonar inducida por aspiración gástrica o asociada con una desregulación inmunitaria o una afección inflamatoria con predisposición genética, tal como fibrosis quística. En algunas modalidades, el trastorno es una afección pulmonar inducida por traumatismo físico (por ejemplo, lesión por ventilación mecánica), enfisema, enfisema inducido por tabaquismo, bronquitis, sarcoidosis, histiocitosis, linfangiomatosis, lesión pulmonar grave, síndrome de dificultad respiratoria grave, enfermedad pulmonar crónica, displasia broncopulmonar, neumonía (por ejemplo, neumonía adquirida en la comunidad, neumonía nosocomial, neumonía asociada a ventilación mecánica, neumonía viral, neumonía bacteriana y neumonía grave), exacerbaciones de las vías aéreas y síndrome de dificultad respiratoria grave (ARDS)). En algunas modalidades, el trastorno pulmonar es EPOC.

20

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno pulmonar es asma. En algunas modalidades, el asma es asma grave crónica y persistente con episodios graves de síntomas agravados (exacerbaciones) que pueden poner en riesgo la vida. En algunas modalidades, el asma es asma atópica (también conocida como alérgica), asma no alérgica (por ejemplo, a menudo desencadenada por una infección con un virus respiratorio (por ejemplo, influenza, parainfluenza, rinovirus, metapneumovirus humano y virus sincitial respiratorio) o irritante inhalado (contaminantes atmosféricos, smog, partículas de diésel, químicos volátiles y gases interiores o al aire libre, o incluso por aire frío seco).

25

30

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el asma es intermitente o inducida por ejercicio, asma debida a exposición primaria crónica o aguda, exposición de segunda mano a

“humo” (típicamente cigarrillos, cigarros, pipas), inhalación o uso de “vaporizadores” (tabaco, marihuana u otras sustancias de este tipo), o asma desencadenada por la ingesta reciente de aspirina o AINE relacionados. En algunas modalidades, el asma es leve o asma sin tratamiento de corticosteroides, asma recientemente diagnosticada y sin tratar o que no haya precisado previamente el uso crónico de esteroides sistémicos o tópicos inhalados para controlar los síntomas (tos, sibilancias, dificultad para respirar/falta de aliento o dolor de pecho). En algunas modalidades, el asma es crónica, asma resistente a corticosteroides, asma refractaria a corticosteroides, asma no controlada con corticosteroides u otros medicamentos de control del asma.

10

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el asma es asma moderada a grave. En determinadas modalidades, el asma es asma con contenido elevado de Th2. En algunas modalidades, el asma es asma grave. En algunas modalidades, el asma es asma atópica, asma alérgica, asma no alérgica (por ejemplo, debido a infección y/o virus sincitial respiratorio (RSV)), asma inducida por ejercicio, asma exacerbada/sensible a la aspirina, asma leve, asma moderada a grave, asma no tratada con corticosteroides, asma crónica, asma resistente a corticosteroides, asma refractaria a corticosteroides, asma recientemente diagnosticada y sin tratar, asma debido a tabaquismo, asma sin controlar con corticosteroides. En algunas modalidades, el asma es de linfocitos auxiliares T de tipo 2 (Th2), de tipo 2 (Th2) elevado o asma provocada por tipo 2 (T2). En algunas modalidades, el asma es asma eosinofílica. En algunas modalidades, el asma es asma alérgica. En algunas modalidades, se determinó que el individuo es positivo para inflamación eosinofílica (EIP). Ver WO2015/061441. En algunas modalidades, el asma es asma con alto contenido de periostina (por ejemplo, posee un nivel de periostina al menos alrededor de cualquiera de 20 ng/mL, 25 ng/mL o 50 ng/mL en suero).

20

25

Los métodos para determinar los niveles de periostina en suero se proporcionan, por ejemplo, en US2012/0156194. En algunas modalidades, el asma es asma con eosinófilos elevados (por ejemplo, al menos alrededor de cualquiera de 150, 200, 250, 300, 350, 400 conteos de eosinófilos/ml de sangre). En determinadas modalidades, el asma es asma con Th2 bajo o asma no provocada por Th2. En algunas modalidades, se determinó que el individuo es negativo para inflamación eosinofílica (EIN). Ver WO2015/061441. En algunas modalidades, el asma es asma con bajo contenido de periostina (por ejemplo, posee un nivel de periostina

30

menor que alrededor de 20 ng/mL en suero). En algunas modalidades, el asma es asma con bajo contenido de eosinófilos (por ejemplo, menor que alrededor de 150 conteos de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre o menor que alrededor de 100 conteos de eosinófilos/ $\mu$ l de sangre). En determinadas modalidades, el individuo presenta un nivel elevado de FeNO (ácido nítrico exhalado fraccional) y/o un nivel elevado de IgE. Por ejemplo, en algunas instancias, el individuo presenta un nivel de FeNO por encima de alrededor de 250 partes por mil millones (ppb), mayor que alrededor de 275 ppb, mayor que alrededor de 300 ppb, mayor que alrededor de 325 ppb, mayor que alrededor de 325 ppb o mayor que alrededor de 350 ppb. En algunas instancias, el individuo posee un nivel de IgE por encima de 50 IU/ml. En algunas modalidades, el individuo posee un volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) del 40 % al 80 % de lo previsto.

En otras modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es fibrosis pulmonar. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

En otras modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es esofagitis (por ejemplo, esofagitis eosinofílica), rinitis alérgica, rinitis no alérgica, rinosinusitis con pólipos, poliposis nasal, bronquitis, neumonía crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, inflamación de las vías aéreas, rinitis alérgica, bronquiectasia y/o bronquitis crónica.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es artritis. En algunas modalidades, la artritis es artritis reumatoide. En algunas modalidades, la artritis es osteoartritis, artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis reumatoide juvenil, artritis temprana, artritis reumatoide poliarticular, artritis reumatoide de aparición sistémica, artritis enteropática, artritis reactiva, artritis psoriática y/o artritis como resultado de una lesión.

En otras modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es una afección inflamatoria gastrointestinal. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es IBD (enfermedad intestinal inflamatoria), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de Crohn (CD), colitis (por ejemplo, colitis provocada por condicionamiento ambiental (por ejemplo, provocada por un régimen terapéutico o asociada con este, tal como quimioterapia, terapia de radiación, etc.)), colitis infecciosa, colitis isquémica, colitis colagenosa o linfocítica, enterocolitis necrosante, colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica o celiaquía, alergias alimentarias, gastritis, gastroenteritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica con infección de *Helicobacter pylori*), esofagitis y otras formas de inflamación gastrointestinal provocada por un agente infeccioso o colitis indeterminada.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrofílico o eosinofílico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico es una afección inflamatoria gastrointestinal. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es IBD (enfermedad intestinal inflamatoria). En algunas modalidades, la enfermedad intestinal inflamatoria es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis (por ejemplo, colitis provocada por condicionamiento ambiental (por ejemplo, provocada por un régimen terapéutico o asociada con este, tal como quimioterapia, terapia de radiación, etc.)), colitis infecciosa, colitis isquémica, colitis colagenosa o linfocítica, enterocolitis necrosante, colitis en afecciones tales como enfermedad granulomatosa crónica o celiaquía, alergias alimentarias, gastritis, gastroenteritis, gastritis infecciosa o enterocolitis (por ejemplo, gastritis activa crónica con infección de *Helicobacter pylori*) y otras formas de inflamación gastrointestinal provocada por un agente infeccioso o colitis indeterminada.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis ulcerosa (UC) o enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es colitis ulcerosa (UC). En algunas modalidades, la colitis ulcerosa es colitis distal leve a moderada. En algunas modalidades, la

colitis ulcerosa es colitis extensiva leve a moderada. En algunas modalidades, la colitis ulcerosa es colitis grave. En algunas modalidades, la afección inflamatoria gastrointestinal es enfermedad de Crohn (CD). En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de enfermedad grave. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de remisión clínica inducida. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn se encuentra en la etapa de remisión/respuesta mantenida. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad leve a moderada. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad moderada a grave. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad grave/fulminante. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad ileal, ileocolónica o colónica.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno granulocítico (neutrófilico o eosinófilico), trastorno monocítico o trastorno linfocítico, o trastorno asociado con una mayor cantidad o distribución de células residentes en tejido anómalo o normal (tales como mastocitos, macrófagos o linfocitos) o células estromales (tales como fibroblastos, miofibroblastos, células de músculo liso, epitelios o endotelios) es lupus o lupus eritematoso sistémico (SLE) o una o más manifestaciones de lupus específicas del órgano (por ejemplo, lupus nefrítico (LN) que afecta el riñón o lupus extrarrenal (ERL) que afecta la sangre y/u órganos linfoides (nódulos linfáticos, bazo, timo y vasos linfáticos asociados), y/o articulaciones y/u otros órganos, pero no necesariamente el riñón).

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio o trastorno fibrótico se relaciona con sepsis y/o traumatismo, infección de VIH o idiopática (de etiología desconocida) tal como vasculitis asociada con ANCA (AAV), granulomatosis con poliangiitis (conocida anteriormente como granulomatosis de Wegener), enfermedad de Behcet, enfermedad cardiovascular, bronquitis eosinofílica, síndrome de Reiter, síndrome de SEA (síndrome de seronegatividad, entesopatía, artropatía), espondilitis anquilosante, dermatomiositis, escleroderma, por ejemplo, escleroderma sistémico, denominado también esclerosis sistémica, vasculitis (por ejemplo, arteritis de células gigantes (GCA), denominada también arteritis temporal, arteritis craneal o enfermedad de Horton),

miositis, polimiositis, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, arteritis, polimialgia reumática, sarcoidosis, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, síndrome de Sjogren, psoriasis, psoriasis de placa, psoriasis guttate, psoriasis inversa, psoriasis pustulosa, psoriasis eritrodérmica, dermatitis, dermatitis atópica, pénfigo, por ejemplo, pénfigo vulgar, aterosclerosis, lupus, enfermedad de Still, miastemia grave, celiaquía, esclerosis múltiple (EM) de subtipo recidivante-remitente (EMRR) o primaria progresiva (EMPP) o secundaria progresiva (EMSP), enfermedad de Guillain-Barre, diabetes mellitus de Tipo I (T1DM) o DM insulino dependiente (IDDM) o de tipo juvenil, tiroiditis (por ejemplo, enfermedad de Graves), enfermedad celíaca, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de mialgia, síndrome hipereosinofílico, reacciones edematosas que incluyen angioedema episódico, infecciones por helminto, dermatitis oncocercal, esofagitis eosinofílica, enteritis eosinofílica, colitis eosinofílica, apnea del sueño obstructiva, fibrosis de endomiocardio, enfermedad de Addison, fenómeno o enfermedad de Raynaud, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) o rechazo de trasplantes de órganos.

15

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno es un trastorno inflamatorio de la piel. En algunas modalidades, el trastorno es dermatitis atópica o dermatitis oncocercal. En algunas modalidades, el trastorno es urticaria idiopática crónica (CIU o CSU). En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista de IL-13, un antagonista de IL-33, un antagonista de IgE, un inhibidor de calcio, un inhibidor de leucotrieno o una antihistamina. En algunas modalidades, el antagonista de IL-13 es lebrikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de IgE es omalizumab o ligelizumab.

25

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es un trastorno fibrótico. En algunas modalidades, los trastornos fibróticos incluyen fibrosis pulmonar, fibrosis hepática (por ejemplo, fibrosis asociada con cirrosis (por ejemplo, cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por virus, cirrosis posterior a hepatitis C y cirrosis biliar primaria), esquistosomiasis, colangitis (por ejemplo, colangitis esclerosante) y hepatitis autoinmunitaria), fibrosis renal (por ejemplo, fibrosis tubulointersticial, escleroderma, nefritis diabética y nefritis

30

glomerular), fibrosis dérmica (por ejemplo, escleroderma, cicatrices hipertróficas y queloides, dermatopatía nefrogénica fibrosante y quemaduras), mielofibrosis, neurofibromatosis, fibroma, fibrosis intestinal y adhesiones fibróticas resultantes de intervenciones quirúrgicas), fibrosis cardíaca (por ejemplo, fibrosis asociada con infarto de miocardio), fibrosis vascular (por ejemplo, fibrosis asociada con aterosclerosis y restenosis arterial posangioplastia), fibrosis ocular (por ejemplo, fibrosis asociada con poscirugía de cataratas, vitreoretinopatía proliferativa y fibrosis retroorbital) y fibrosis de médula ósea (por ejemplo, mielofibrosis idiopática y mielofibrosis inducida por fármacos). La fibrosis puede ser específica de un órgano o sistémica (por ejemplo, esclerosis sistémica y fibrosis asociada con GVHD). En algunas modalidades, el trastorno fibrótico es fibrosis pulmonar. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es neumonía intersticial fibrosante. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar idiopática (IPF), también conocida como alveolitis fibrosante criptogénica. En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa I de género, edad y fisiología (GAP). En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa II de GAP. En algunas modalidades, la IPF se encuentra en la etapa III de GAP. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es IPF esporádica. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar familiar. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar es fibrosis pulmonar combinada y enfisema. En algunas modalidades, la fibrosis pulmonar se asocia con uno o más de los siguientes: neumonía intersticial usual; neumonía intersticial idiopática; neumonía intersticial descamativa; bronquiolitis respiratoria-enfermedad pulmonar intersticial; neumonía intersticial grave; neumonía intersticial no específica; sarcoidosis; neumonía organizada criptogénica; neumonía eosinofílica; infección; exposición a agentes ocupacionales o ambientales; tabaquismo; enfermedad pulmonar intersticial inducida por fármacos o radiación; enfermedad pulmonar intersticial asociada a enfermedades reumáticas; neumonía intersticial linfocítica; fibroelastosis pleuropulmonar; histiocitosis pulmonar de células de Langerhans; esclerosis sistémica-enfermedad pulmonar intersticial; síndrome de Hermansky-Pudlak; y telomeropatía.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la

- categoría A de la iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GOLD). En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría B de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría C de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC se encuentra en la categoría D de GOLD. En algunas modalidades, la EPOC es
- 5 bronquitis crónica. En algunas modalidades, la EPOC es enfisema. En algunas modalidades, el enfisema es enfisema acinar proximal, panacinar o acinar distal. En algunas modalidades, el enfisema es enfisema inducido por tabaquismo. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con la exposición a particulados de polvo, vapores químicos y/o contaminación del aire. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con una alteración del desarrollo pulmonar. En
- 10 algunas modalidades, la EPOC es asma obstructiva crónica. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con una deficiencia de antitripsina alfa-1. En algunas modalidades, la EPOC se asocia con la alteración del inhibidor de la serina proteasa clado E, miembro 2 (SERPINE2). En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con inflamación sistémica persistente. En algunas modalidades, la EPOC es EPOC eosinofílica o con alto contenido de
- 15 linfocitos T auxiliares de tipo 2 ( $T_H2$ ). En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con colonización bacteriana persistente. En algunas modalidades, la EPOC es EPOC con exacerbaciones frecuentes. En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es síndrome de superposición de asma-EPOC (ACOS). En algunas modalidades, el ACOS es ACOS con
- 20 eosinófilos predominantes, neutrófilos predominantes, de patrón mixto o sin inflamación (paucigranulocitario). En algunas modalidades, el trastorno autoinmunitario, trastorno inflamatorio, trastorno fibrótico, trastorno neutrofílico o trastorno eosinofílico es síndrome de superposición de EPOC-apnea obstructiva del sueño (OSA).
- 25 Los anticuerpos de la invención o composiciones farmacéuticas de estos pueden utilizarse por sí solos o junto con otros agentes en una terapia. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención o una composición farmacéutica de este puede administrarse de forma conjunta con al menos un agente terapéutico adicional. En determinadas modalidades, un agente terapéutico adicional es un antagonista de unión de interleucina-13 (IL-13), un antagonista de unión al eje
- 30 de interleucina-17 (IL-17), un antagonista de unión al eje de interleucina-5 (IL-5) o un antagonista de unión al eje de IL-33. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje

IL-13 es un anticuerpo contra IL-13, por ejemplo, lebrikizumab. En algunas modalidades, el antagonista de unión al eje de IL-5 es un antagonista de unión a IL-5 o un antagonista de unión al receptor de IL-5. En algunas modalidades, un antagonista de unión al eje de IL-33 es un antagonista de unión a IL-33 o un antagonista de unión a ST2. En algunas modalidades, el antagonista de unión a IL-33 es un anticuerpo contra IL-33.

En algunas modalidades, un agente terapéutico adicional es una terapia para el asma, tal como se describe más adelante. El asma moderada se trata en la actualidad con corticosteroides antiinflamatorios o un inhibidor de mastocitos como cromolina sódica o nedocromil más un agonista de beta 2 inhalado según sea necesario (3-4 veces al día) para aliviar los síntomas del brote o el asma inducida por alérgenos o ejercicio. Los ejemplos de corticosteroides inhalados incluyen QVAR®, PULMICORT®, SYMBICORT®, AEROBID®, FLOVENT®, FLONASE®, ADVAIR® y AZMACORT®. Otras terapias para el asma incluyen broncodilatadores de acción prolongada (LABD, por sus siglas en inglés). En determinadas modalidades, el LABD es un agonista de beta 2 de acción prolongada (LABA, por sus siglas en inglés), antagonista de receptor de leucotrieno (LTRA, por sus siglas en inglés), antagonista muscarínico de acción prolongada (LAMA, por sus siglas en inglés), teofilina o corticosteroides orales (OCS, por sus siglas en inglés). Los ejemplos de LABD incluyen SYMBICORT®, ADVAIR®, BROVANA®, FORADIL®, PERFOROMIST™ y SEREVENT®.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un broncodilatador o medicamento de control de los síntomas del asma. En algunas modalidades, el broncodilatador o medicamento para el control del asma es un agonista adrenérgico de  $\beta_2$ , tal como un agonista de  $\beta_2$  de corta acción (SABA, por sus siglas en inglés) (tal como albuterol) o un agonista adrenérgico de  $\beta_2$  de acción prolongada (LABA). En algunas modalidades, el LABA es salmeterol, abediterol, indacaterol, vilanterol y/o formoterol (fumarato de formoterol deshidratado). En algunas modalidades, el medicamento para el control del asma es un antagonista del receptor de leucotrieno (LTRA). En algunas modalidades, el LTRA es montelukast, zafirlukast y/o zileuton. En algunas modalidades, el broncodilatador o medicamento para el control del asma es un antagonista muscarínico, tal como un antagonista (colinérgico) del receptor de acetilcolina muscarínico de acción

prolongada (LAMA). En algunas modalidades, el LAMA es glicopirronio. En algunas modalidades, el broncodilatador o medicamento para el control del asma es un agonista de un canal iónico tal como un receptor del sabor amargo (tal como TAS2R).

- 5 En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un broncodilatador. En determinadas modalidades, el broncodilatador es un broncodilatador inhalado. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es un agonista adrenérgico de  $\beta_2$ . En algunas modalidades, el agonista adrenérgico de  $\beta_2$  es un agonista adrenérgico de  $\beta_2$  de corta acción (SABA). En algunas modalidades, el SABA es bitolterol, fenoterol, isoproterenol, levalbuterol, metaproterenol, pirbuterol, procaterol, ritodrina, albuterol y/o terbutalina. En algunas modalidades, el agonista adrenérgico de  $\beta_2$  es un agonista adrenérgico de  $\beta_2$  de acción prolongada (LABA). En algunas modalidades, el LABA es arformoterol, bambuterol, clenbuterol, formoterol, salmeterol, abediterol, carmoterol, indacaterol, olodaterol y/o vilanterol. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es un antagonista del receptor muscarínico. En algunas modalidades, el antagonista del receptor muscarínico es un antagonista del receptor muscarínico de corta acción (SAMA). En algunas modalidades, el SAMA es bromuro de ipratropio. En algunas modalidades, el antagonista del receptor muscarínico es un antagonista del receptor muscarínico de acción prolongada (LAMA). En algunas modalidades, el LAMA es bromuro de tiotropio, bromuro de glicopirronio, bromuro de umeclidinio, bromuro de aclidinio y/o revefenacina. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es una combinación de SABA/SAMA. En algunas modalidades, la combinación de SABA/SAMA es albuterol/ipratropio. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es una combinación de LABA/LAMA. En algunas modalidades, la combinación de LABA/LAMA es formoterol/aclidinio, formoterol/glicopirronio, formoterol/tiotropio, indacaterol/glicopirronio, indacaterol/tiotropio, olodaterol/tiotropio, salmeterol/tiotropio y/o vilanterol/umeclidinio. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es un broncodilatador bifuncional. En algunas modalidades, el broncodilatador bifuncional es un antagonista muscarínico/agonista de  $\beta_2$  (MABA). En algunas modalidades, el MABA es batefenterol, THRX 200495, AZD 2115, LAS 190792, TEI3252, PF-3429281 y/o PF-4348235. En algunas modalidades, el broncodilatador inhalado es un agonista de TAS2R. En determinadas modalidades, el broncodilatador es un SABA nebulizado. En algunas

modalidades, el SABA nebulizado es albuterol y/o levalbuterol. En determinadas modalidades, el broncodilatador es un LABA nebulizado. En algunas modalidades, el LABA nebulizado es arfomoterol y/o formoterol. En determinadas modalidades, el broncodilatador es un SAMA nebulizado. En algunas modalidades, el SAMA nebulizado es ipratropio. En determinadas modalidades, el broncodilatador es un LAMA nebulizado. En algunas modalidades, el LAMA nebulizado es glicopirronio y/o revefenacina. En determinadas modalidades, el broncodilatador es una combinación de SABA/SAMA nebulizados. En algunas modalidades, la combinación de SABA/SAMA nebulizados es albuterol/ipratropio. En algunas modalidades, el broncodilatador es un antagonista del receptor de leucotrieno (LTRA). En algunas modalidades, el LTRA es montelukast, zafirlukast y/o zileuton. En determinadas modalidades, el broncodilatador es una metilxantina. En algunas modalidades, la metilxantina es teofilina.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inmunomodulador. En algunas modalidades, el inmunomodulador es un anticuerpo de la inmunoglobulina de tipo E (IgE) o anti-IgE (un inhibidor de IgE). En algunas modalidades, el anti-IgE es omalizumab o ligelizumab. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además cromolina. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además metilxantina. En algunas modalidades, la metilxantina es teofilina o cafeína.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar uno o más corticosteroides, tales como un corticosteroide inhalado (ICS) o un corticosteroide oral. Los ejemplos no taxativos de corticosteroides incluyen corticosteroides inhalados, tales como dipropionato de beclometasona, budesonida, ciclesonida, flunisolida, propionato de fluticasona, furoato de fluticasona, mometasona y/o acetona de triamcinolona y corticosteroides orales, tales como metilprednisolona, prednisolona y prednisona. En algunas modalidades, el corticosteroide es un ICS. En algunas modalidades, el ICS es beclometasona, budesonida, flunisolida, furoato de fluticasona, propionato de fluticasona, mometasona, ciclesonida y/o triamcinolona. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar una combinación de ICS/LABA y/o LAMA. En algunas modalidades, la combinación de ICS/LABA y/o LAMA es propionato de

fluticasona/salmeterol, budesonida/formoterol, mometasona/formoterol, furoato de fluticasona/vilanterol, propionato de fluticasona/formoterol, beclometasona/formoterol, furoato de fluticasona/umeclidinio, furoato de fluticasona/vilanterol/umeclidinio, fluticasona/salmeterol/tiotropio, beclometasona/formoterol/glicopirronio, budesonida/formoterol/glicopirronio y/o budesonida/formoterol/tiotropio. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un corticosteroide nebulizado. En algunas modalidades, el corticosteroide nebulizado es budesonida. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un corticosteroide oral o intravenoso. En algunas modalidades, el corticosteroide oral o intravenosa es prednisona, prednisolona, metilprednisolona y/o hidrocortisona.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de la vía T2 o TH2 que inhibe uno o más objetivos que se seleccionan de ITK, BTK, JAK (JAK1, JAK2 y/o JAK3), IL-9, IL-6, IL-5, IL-13, IL-4, IL-17 (por ejemplo, IL-17A e IL-17F), OX40L, TSLP, IL-25, IL-33, IgE, receptor de IL-9, receptor de IL-5, receptor  $\alpha$  de IL-4, receptor de IL-13 (por ejemplo, receptor  $\alpha 1$  y/o  $\alpha 2$  de IL-13), OX40, TSLP-R, receptor de IL-7 (por ejemplo, IL7R $\alpha$ ), receptor de IL-17 (por ejemplo, IL-17R $\beta$ ), ST2 (receptor de IL-33), CCR3, CCR4, CRTH2, Fc $\epsilon$ RI, Fc $\epsilon$ RII/CD23, Flap, cinasa Syk; CCR4, TLR9, CCR3, antagonista del receptor de quimiocina y GM-CSF. En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de IL-5. En algunas modalidades, el antagonista de IL-5 es benralizumab, mepolizumab y/o reslizumab. En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de IL-13. En algunas modalidades, el antagonista de IL-13 es lebrikizumab, dectrekumab o tralokinumab. En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de IL-4 (que incluye un antagonista de IL-4/IL-13). En algunas modalidades, el antagonista de IL-4 es dupilumab o QBX-258 (Novartis). En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de TSLP. En algunas modalidades, el antagonista de TSLP es AMG-157 (MEDI-9929). En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de ST2. En algunas modalidades, el método comprende además administrar un antagonista de IL-17. En algunas modalidades, el antagonista de IL-17 es secukinumab, ixekizumab o

bimekizumab. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar fevipiprant. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar masitinib. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista o inhibidor de fosfodiesterasa (PDE), tal como un antagonista de PDE3 y/o PDE4. En algunas modalidades, el antagonista de PDE es Theo-24, daliresp o roflumilast.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar uno o más ingredientes activos que se seleccionan de un aminosalicilato; un esteroide; un agente biológico; una tiopurina; metotrexato; un inhibidor de calcineurina, por ejemplo, ciclosporina o tacrolimus; y un antibiótico. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende administrar el ingrediente activo adicional en una formulación oral o tópica. Los ejemplos de aminosalicilatos incluyen ácido 4-aminosalicílico, sulfasalazina, balsalazida, olsalazina y mesalazina, en formas como recubierta con Eudragit-S, mesalamina dependiente de pH, mesalamina recubierta con etilcelulosa y mesalamina de liberación multimatrical. Los ejemplos de esteroides incluyen corticosteroides o glucocorticosteroides. Los ejemplos de un corticosteroide incluyen prednisona e hidrocortisona o metilprednisolona, o un corticosteroide de segunda generación, por ejemplo, budesonida o azatioprina; por ejemplo, en formas como un enema de hidrocortisona o una espuma de hidrocortisona. Los ejemplos de agentes biológicos incluyen etanercept; un anticuerpo del factor de necrosis tumoral alfa, por ejemplo, infliximab, adalimumab o certolizumab; un anticuerpo de IL-12 e IL-23, por ejemplo, ustekinumab; vedolizumab; etrolizumab y natalizumab. Los ejemplos de tiopurinas incluyen azatioprina, 6-mercaptopurina y tioguanina. Los ejemplos de antibióticos incluyen vancomicina, rifaximina, metronidazol, trimetoprim, sulfametoxazol, diaminodifenilsulfona y ciprofloxacina; y agentes antivirales como ganciclovir.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un agente antifibrótico. En algunas modalidades, el agente antifibrótico inhibe la síntesis de colágeno estimulada por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), disminuye la matriz extracelular y/o bloquea la proliferación de fibroblastos. En algunas modalidades, el agente antifibrótico es pirfenidona. En algunas modalidades, el agente

antifibrótico es PBI-4050. En algunas modalidades, el agente antifibrótico es tipelukast.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de tirosina cinasa. En algunas modalidades, el inhibidor de tirosina cinasa inhibe una tirosina cinasa que media la elaboración de uno o más factores de crecimiento fibrogénicos. En algunas modalidades, el factor de crecimiento fibrogénico es factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento endotelial vascular y/o factor de crecimiento de fibroblastos. En algunas modalidades, el inhibidor de tirosina cinasa es imatinib y/o nintedanib. En algunas modalidades, el inhibidor de tirosina cinasa es nintedanib. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un agente antidiarreico. En algunas modalidades, el agente antidiarreico es loperamida.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo contra interleucina (IL)-13. En algunas modalidades, el anticuerpo contra IL-13 es tralokinumab. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-4/anti-IL-13. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-IL-4/anti-IL-13 es SAR 156597. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo contra el factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, el anticuerpo contra CTGF es FG-3019. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo contra tipo lisil oxidasa 2 (LOXL2). En algunas modalidades, el anticuerpo contra LOXL2 es simtuzumab. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor de integrina  $\alpha\beta 6$ . En algunas modalidades, el anticuerpo contra el receptor de integrina  $\alpha\beta 6$  es STX-100. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista del receptor de ácido lisofosfatídico-1 (LPA1). En algunas modalidades, el antagonista del receptor de LPA1 es BMS-986020. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de glectina 3. En algunas modalidades, el inhibidor de glectina 3 es TD-139.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar una terapia paliativa. En algunas modalidades, la terapia paliativa comprende uno o más de un antibiótico, un ansiolítico, un corticosteroide y un opioide. En algunas modalidades, el antibiótico es un antibiótico de amplio espectro. En algunas modalidades, el antibiótico es penicilina, un inhibidor de  $\beta$ -lactamasa y/o una cefalosporina. En algunas modalidades, el antibiótico es piperacilina/tazobactam, cefixima, ceftriaxona y/o cefdinir. En algunas modalidades, el ansiolítico es alprazolam, buspirona, clorpromazina, diazepam, midazolam, lorazepam y/o prometazina. En algunas modalidades, el corticosteroide es un glucocorticosteroide. En algunas modalidades, el glucocorticosteroide es prednisona, prednisolona, metilprednisolona y/o hidrocortisona. En algunas modalidades, el opioide es morfina, codeína, dihidrocodeína y/o diamorfina.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antibiótico. En algunas modalidades, el antibiótico es un macrólido. En algunas modalidades, el macrólido es azitromicina y/o claritromicina. En algunas modalidades, el antibiótico es doxiciclina. En algunas modalidades, el antibiótico es trimetoprim/sulfametoxazol. En algunas modalidades, el antibiótico es una cefalosporina. En algunas modalidades, la cefalosporina es cefepima, cefixima, cefpodoxima, cefprozil, ceftazidima y/o cefuroxima. En algunas modalidades, el antibiótico es penicilina. En algunas modalidades, el antibiótico es amoxicilina, ampicilina y/o pivampicilina. En algunas modalidades, el antibiótico es una combinación de inhibidor de  $\beta$ -lactamasa/penicilina. En algunas modalidades, la combinación de inhibidor de  $\beta$ -lactamasa/penicilina es amoxicilina/clavulanato y/o piperacilina/tazobactam. En algunas modalidades, el antibiótico es una fluoroquinolona. En algunas modalidades, la fluoroquinolona es ciprofloxacina, gemifloxacina, levofloxacina, moxifloxacina y/u ofloxacina.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de fosfodiesterasa. En algunas modalidades, el inhibidor de fosfodiesterasa es un inhibidor de fosfodiesterasa tipo 5. En algunas modalidades, el inhibidor de fosfodiesterasa es avanafil, benzamidenafil, dasantafil, icariina, lodenafil, mirodenafil,

sildenafil, tadalafil, udenafil y/o vardenafil. En algunas modalidades, el inhibidor de PDE es un inhibidor de PDE-4. En algunas modalidades, el inhibidor de PDE-4 es roflumilast, cilomilast, tetomilast y/o CHF6001. En algunas modalidades, el inhibidor de PDE es un inhibidor de PDE-3/PDE-4. En algunas modalidades, el inhibidor de PDE-3/PDE-4 es RPL-554.

5

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un agente citotóxico y/o inmunosupresivo. En algunas modalidades, el agente citotóxico y/o inmunosupresivo es azatioprina, colchicina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina y/o talidomida. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un agente que recupera los niveles de glutatión en el pulmón. En algunas modalidades, el agente que recupera los niveles de glutatión en el pulmón es *N*-acetilcisteína. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un anticoagulante. En algunas modalidades, el anticoagulante es warfarina, heparina, proteína C activada y/o inhibidor de la vía del factor tisular.

10

15

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista del receptor de endotelina. En algunas modalidades, el antagonista del receptor de endotelina del método es bosentán, macitentan y/o ambrisentan. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista de TNF- $\alpha$ . En algunas modalidades, el antagonista de TNF- $\alpha$  comprende uno o más de etanercept, adalimumab, infliximab, certolizumab y golimumab. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar interferón gamma-1b.

20

25

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de interleucina (IL). En algunas modalidades, el inhibidor de IL es un inhibidor de IL-5. En algunas modalidades, el inhibidor de IL-5 es mepolizumab y/o benralizumab. En algunas modalidades, el inhibidor de IL es un inhibidor de IL-17A. En algunas modalidades, el inhibidor de IL-17A es CNTO-6785.

30

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un inhibidor de proteína cinasa activado por mitógeno (MAPK) p38. En algunas modalidades, el inhibidor de MAPK p38 es losmapimod y/o AZD-7624. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un antagonista de CXCR2. En algunas modalidades, el antagonista de CXCR2 es danirixina.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además vacunación. En algunas modalidades, la vacunación es vacunación contra neumococos y/o influenza. En algunas modalidades, la vacunación es vacunación contra *Streptococcus pneumoniae* y/o influenza. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar una terapia antiviral. En algunas modalidades, la terapia antiviral es oseltamivir, peramivir y/o zanamivir.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además la prevención de reflujo gastroesofágico y/o microaspiración recurrente.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además un soporte de ventilación. En algunas modalidades, el soporte de ventilación es ventilación mecánica. En algunas modalidades, el soporte de ventilación es ventilación no invasiva. En algunas modalidades, el soporte de ventilación es oxígeno complementario. En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además rehabilitación pulmonar.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además trasplante pulmonar. En algunas modalidades, el trasplante pulmonar es un trasplante de un solo pulmón. En algunas modalidades, el trasplante pulmonar es un trasplante pulmonar bilateral.

En algunas modalidades de cualquiera de los métodos, el método comprende además una intervención no farmacológica. En algunas modalidades, la intervención no farmacológica es cesación del tabaquismo, una dieta saludable y/o ejercicio regular. En algunas modalidades

de cualquiera de los métodos, el método comprende además administrar un auxiliar farmacológico para dejar de fumar. En algunas modalidades, el auxiliar farmacológico para dejar de fumar es una terapia de reemplazo de nicotina, bupropión y/o vareniclina. En algunas modalidades, la intervención no farmacológica es una terapia pulmonar. En algunas modalidades, la terapia pulmonar es rehabilitación pulmonar y/u oxígeno complementario. En algunas modalidades, la intervención no farmacológica es una cirugía pulmonar. En algunas modalidades, la cirugía pulmonar es una cirugía de reducción del volumen pulmonar, trasplante de un solo pulmón, trasplante de pulmones bilateral o bulectomía. En algunas modalidades, la intervención no farmacológica es el uso de un dispositivo. En algunas modalidades, el dispositivo es un espiral de reducción del volumen pulmonar, un stent de exhalación en las vías aéreas y/o un sistema de soporte de ventilación nasal.

Dichas terapias de combinación indicadas anteriormente comprenden la administración combinada (donde dos o más agentes terapéuticos se incluyen en la misma formulación o en formulaciones separadas), y la administración separada, en cuyo caso, la administración de un anticuerpo contra triptasa, o una composición farmacéutica de este, puede producirse antes, simultáneamente y/o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En una modalidad, la administración de un anticuerpo contra triptasa, o composición farmacéutica de este, y la administración de un agente terapéutico adicional se producen dentro de alrededor de un mes; dentro de alrededor de una, dos o tres semanas; dentro de alrededor de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días; dentro de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 horas; o dentro de alrededor de 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 minutos, entre sí. Para modalidades que implican una administración secuencial, el anticuerpo contra triptasa puede administrarse antes o después de la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Un anticuerpo contra triptasa de la invención, o composiciones farmacéuticas de este (y cualquier agente terapéutico adicional), puede administrarse a través de cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, intrapulmonar e intranasal. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. En algunas instancias, un anticuerpo contra triptasa de la invención puede

administrarse por vía intravítrea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, percutánea, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleuraleal, intratraqueal, intratecal, intranasal, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, peritoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, intraorbital, oral, tópica, transdérmica, periocular, conjuntival, subtenoniana, intracameral, subretinal, retrobulbar, intracanalicular, mediante inhalación, mediante inyección, mediante implante, mediante infusión, mediante infusión continua, mediante perfusión localizada que afecta las células objetivo de forma directa, mediante catéter, mediante lavado, en cremas o en composiciones lipídicas. En casos particulares, el anticuerpo, o una composición farmacéutica de este, puede administrarse mediante administración subcutánea. Las composiciones utilizadas en los métodos descritos en la presente también pueden administrarse de forma sistémica o local. La dosificación puede ser mediante cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosas o subcutáneas, que dependen en parte de si la administración es breve o crónica. En la presente se contemplan varios cronogramas de dosificación que incluyen, de modo no taxativo, administraciones individuales o múltiples en varios momentos, administración por bolo e infusión por pulso.

Los anticuerpos de la invención, o composiciones farmacéuticas de estos, se formularían, dosificarían y administrarían de una manera congruente con la práctica clínica habitual. Los factores que deben considerarse en este contexto incluyen el trastorno en particular que se trate, el mamífero particular que se trate, la afección médica del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores conocidos por los médicos. El anticuerpo o composición farmacéutica de este se formula opcionalmente con uno o más agentes que se utilizan en la actualidad para prevenir o tratar el trastorno en cuestión, aunque esto no es necesario. La cantidad eficaz de dichos agentes adicionales depende de la cantidad de anticuerpo presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores mencionados anteriormente. Estos se utilizan generalmente en las mismas dosificaciones y mediante las mismas vías de administración descritas en la presente, o de alrededor de 1 a 99 % de las dosificaciones descritas en la presente, o en cualquier dosificación y por cualquier

vía que se determine adecuada de forma empírica/clínica.

Para la prevención o el tratamiento de enfermedades, la dosificación adecuada de un anticuerpo de la invención (cuando se usa solo o junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia anterior, historial clínico del paciente y respuesta al anticuerpo, así como el criterio del médico tratante. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente en un momento o en una serie de tratamientos. De acuerdo con el tipo y la gravedad de la enfermedad, una posible dosis inicial a administrar al paciente puede ser de alrededor de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0.1 mg/kg a 10 mg/kg) de anticuerpo, por ejemplo, ya sea en una o más administraciones independientes o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica puede encontrarse en el intervalo de alrededor de 1 µg/kg a 200 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se sostendrá generalmente hasta que ocurra la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. Un ejemplo de dosificación del anticuerpo generalmente se encuentra en el intervalo de alrededor de 0.05 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de alrededor de 0.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 4.0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de estas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas o cada cuatro semanas (por ejemplo, de manera que el paciente reciba de alrededor de dos a alrededor de veinte, por ejemplo, alrededor de seis dosis del anticuerpo). Por ejemplo, puede administrarse una dosis una vez al mes (por ejemplo, mediante inyección subcutánea). Puede administrarse una dosis inicial de carga mayor, seguida por una o más dosis menores. No obstante, pueden resultar útiles otras pautas de dosificación. Es posible controlar la evolución de esta terapia mediante ensayos y técnicas convencionales. En algunas instancias, puede administrarse una dosis de alrededor de 50 mg/mL a alrededor de 200 mg/mL (por ejemplo, alrededor de 50 mg/mL, alrededor de 60 mg/mL, alrededor de 70 mg/mL, alrededor de 80 mg/mL, alrededor de 90 mg/mL, alrededor de 100 mg/mL, alrededor de 110 mg/mL, alrededor de 120 mg/mL, alrededor de 130 mg/mL, alrededor de 140 mg/mL, alrededor de 150 mg/mL, alrededor de 160 mg/mL, alrededor de 170 mg/mL, alrededor de 180

mg/mL, alrededor de 190 mg/mL o alrededor de 200 mg/mL, por ejemplo, mediante inyección subcutánea. En algunas instancias, pueden administrarse alrededor de 150 mg/mL de un anticuerpo mediante inyección subcutánea.

- 5 Se entiende que cualquiera de las formulaciones o métodos terapéuticos anteriores pueden llevarse a cabo mediante el uso de un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo contra triptasa o además de este.

#### *H. Artículos de fabricación*

10

- En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente (por ejemplo, trastornos asociados con triptasa). El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con este. Los  
15 recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, bolsas de solución IV, etc. Los recipientes pueden fabricarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí misma o combinada con otra composición, es eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución  
20 intravenosa o vial que tenga un tapón que pueda perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo de la invención o una composición farmacéutica de este. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza en el tratamiento de la afección elegida. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición incluida en este, donde la  
25 composición comprende un anticuerpo de la invención y (b) un segundo recipiente con una composición incluida en este, donde la composición comprende un agente terapéutico adicional. El artículo de fabricación de esta modalidad de la invención puede comprender además un prospecto que indique que las composiciones pueden usarse para tratar una afección en particular. De manera alternativa o adicional, el artículo de fabricación puede  
30 comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI, por sus

siglas en inglés), solución salina amortiguada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario que incluyen otras soluciones amortiguadoras, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

5

Se entiende que cualquiera de los artículos de fabricación que anteceden puede incluir un inmunoconjugado de la invención en lugar de un anticuerpo contra triptasa o además de este.

### III. Ejemplos

10

A continuación se presentan ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Debe entenderse que pueden llevarse a la práctica otras modalidades diferentes, dada la descripción general proporcionada anteriormente. A menos que se indique específicamente, se utilizó triptasa humana beta 1 en los estudios.

15

#### **Ejemplo 1: Generación y humanización de anticuerpos contra triptasa**

##### *A. Materiales y métodos*

20 Los números de residuos son de acuerdo con Kabat et ál. *Sequences of proteins of immunological interest*, 5.<sup>ta</sup> ed., Public Health Service, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD, 1991.

(i) *Expresión recombinante y purificación de triptasa en células de insectos y células de*  
25 *mamífero*

La secuencia que codifica la triptasa humana beta 1 madura de tipo salvaje (numeración de quimotripsinógeno Ile16 - Pro246, SEQ ID NO: 97) se clonó en un vector pAcGP67A modificado detrás del promotor de poliedro y la secuencia señal de secreción gp67. A menos  
30 que se indique lo contrario, en este apartado, la triptasa hace referencia a la triptasa humana beta 1 (también denominada triptasa humana b1). La construcción contiene un marcador His6

de extremo N, un sitio de escisión de enteroquinasa y, para algunas construcciones, un marcador FLAG del extremo C. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio mediante el uso de protocolos QuikChange™ (Stratagene) para generar mutantes de triptasa. Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Se generaron baculovirus recombinantes mediante el uso del sistema BaculoGold™ (BD Biosciences) en células Sf9 con protocolos estándar. Se infectaron células de *Trichoplusia ni* para una producción de proteínas a gran escala y se cosecharon 48 horas después de la infección. El medio cosechado se complementó con NiCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 5 mM y Tris 20 mM a pH 8, se agitó durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 20 minutos a 8500 x g para retirar las células y el precipitado del medio. El medio sobrenadante se filtró a través de un filtro de polietersulfona (PES) de 0.22 µm antes de cargarlo en una columna de afinidad a níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA). También se expresó la triptasa humana beta 1 mediante transfección transitoria en la línea celular de mamífero CHO DP12. El medio de cultivo celular se sometió a la misma purificación comenzando por la purificación de afinidad de Ni-NTA que se describe más adelante.

El medio celular de insectos o medio celular de CHO que contiene triptasa recombinante marcada con His6 secretada (de tipo salvaje o mutante) se cargó en una columna Ni-NTA Superflow de 10 mL (Qiagen) a una velocidad de flujo volumétrico de 170 cm/h. La columna se lavó con 10 CV (volúmenes de columna) de amortiguador de lavado (Tris 20 mM a pH 8, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM) y se eluyó con 8 CV de amortiguador de elución (Tris 20 mM a pH 8, imidazol 300 mM, NaCl 300 mM). Las fracciones sometidas a ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) que contenían triptasa se acumularon, se concentraron y se cargaron en una columna de exclusión por tamaño S200 (GE Healthcare) para purificación adicional mediante el uso de amortiguador de ejecución (ácido 3-(*N*-morfolino)propanosulfónico (MOPS) 10 mM a pH 6.8, NaCl 2 M) a velocidades de flujo recomendadas por el fabricante. Las fracciones que contenían la triptasa recombinante marcada con His (monomérica) se acumularon y se concentraron. Luego se escindió la triptasa recombinante durante la noche a temperatura ambiente a una concentración de 2 mg/ml en amortiguador (MOPS 10 mM a pH 6.8, NaCl 0.2 M) que contenía 0.5 mg/ml de heparina (Sigma Aldrich) y 0.1 mg/ml de enterocinasa (New England Biolabs, Inc). Esta etapa

elimina la etiqueta His6 del extremo N y tiene como resultado la tetramerización y triptasa proteolíticamente activa, que posee IVGG como la secuencia del extremo N formada recientemente que inicia en el residuo 16 (numeración de quimotripsinógeno). Luego se sometió la triptasa tetramérica a cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna S200 (GE Healthcare) en amortiguador (MOPS 10 mM a pH 6.8 y NaCl 2 M) para purificar la triptasa tetramérica mediante la eliminación de enterocinasa y cualquier triptasa recombinante no escindida.

Los mutantes de triptasa Y75C e I99C, así como el mutante catalíticamente inactivo S195A (numeración de quimotripsinógeno, correspondiente a la sustitución de Ser224 a Ala de la secuencia de triptasa de longitud completa SEQ ID NO: 71) se purificaron mediante cromatografía de afinidad a Ni, tal como se describió anteriormente. Luego se separaron los mutantes diméricos de triptasa unidos a disulfuro de los mutantes monoméricos de triptasa no unidos a disulfuro mediante cromatografía de exclusión por tamaño S200. Los mutantes diméricos unidos a disulfuro se procesaron adicionalmente en tetrámeros tal como se describió anteriormente para la triptasa de tipo salvaje.

*(ii) Generación de anticuerpo monoclonal de ratón y conejo contra triptasa humana*

Se inmunizaron dos conejos con triptasa humana beta 1 derivada de CHO (tetrámero) con adyuvante completo de Freund (CFA, por sus siglas en inglés). Se inmunizó a los conejos con la misma proteína, con el adyuvante incompleto de Freund (IFA, por sus siglas en inglés), una vez cada 2 semanas. Luego de 4 inyecciones, se analizaron muestras en suero purificadas para detectar la unión mediante análisis de inmunoadsorción enzimática (ELISA) e inhibición de la actividad de triptasa humana mediante el uso de un ensayo de actividad enzimática. Los linfocitos B de bazo cosechados de uno de los conejos que demostraron la inhibición de la actividad de la triptasa humana se fusionaron luego con un compañero de fusión de conejo. Luego de 10-14 días, se cosecharon los sobrenadantes y se analizaron para determinar la unión mediante ELISA.

El protocolo de ELISA fue el siguiente. Se recubrieron placas de ELISA NUNC MAXISORB®

de 96 pocillos durante la noche con proteína de unión a biotina NeutrAvidin® (Thermo Scientific, n.º de catálogo 31000, 10 mg/ml de solución madre) a 5 µg/ml, 100 µl/pocillo. Los pocillos se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (PBS con TWEEN®-20 al 0.05 %) y se secaron con material absorbente. Luego se bloquearon los pocillos con 200 µl/pocillo de amortiguador de bloqueo (PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5 % y TWEEN®-20 al 0.05 %) y se incubaron durante 30 minutos o más a temperatura ambiente. Se agregó proteína triptasa humana beta 1 (diluida en amortiguador de ensayo; PBS con BSA al 0.5 %, TWEEN®-20 al 0.5 % y 0.1 mg/ml de heparina) a los pocillos a 1 µg/ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora ±10 minutos. Se incluyó heparina para garantizar que la triptasa permaneciera como tetrámero. Los pocillos se lavaron tres veces con amortiguador de lavado (200 µl/pocillo) y se secaron con material absorbente. Se agregaron los sobrenadantes (muestras) o controles de hibridoma (por ejemplo, los controles positivos con anticuerpo policlonal purificado de conejo YZ4209 (0.25 mg/ml de solución madre) a los pocillos (diluido en amortiguador de ensayo, 100 µl/pocillo) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego se lavaron los pocillos tres veces con amortiguador de lavado (200 µl/pocillo) y se secaron con material absorbente. Se agregó conjugado de peroxidasa del rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés) (IgG anticonejo de cabra (H+L) HRP; Thermo Scientific n.º de catálogo 31460) (diluido 1:10.000 en amortiguador de ensayo, 100 µl/pocillo) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron nuevamente tres veces con amortiguador de lavado (200 µl/pocillo) y se secaron con material absorbente. Se agregó el sustrato (sustrato BioFX TMB, n.º de producto: TMBW-1000-01) (100 µl/pocillo) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de solución de detención BioFX (n.º de producto: BSTP-0100-01) y se leyeron las placas a A<sub>650</sub>.

Todos los clones con resultado de ELISA positivo se purificaron mediante cromatografía por afinidad mediante el uso de métodos estándar (MabSelect SuRe™; GE Healthcare) y luego se analizaron para detectar la inhibición de la actividad de triptasa humana en un ensayo de actividad de triptasa recombinante. En resumen, se diluyeron anticuerpos de 0.007 a 100.000 ng/mL (0.046 pM a 667 nM) en PBS, pH 7.4. La triptasa humana beta 1 recombinante se diluyó a 3 nM en amortiguador TNH (Tris 200 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/mL de heparina,

- TRITON™ X-100 al 0.01 %, pH 8.0) y anticuerpos contra triptasa combinados 1:1 con placas negras de 384 pocillos (ViewPlate-384 F, negras de fondo transparente, Perkin Elmer, n.º de catálogo 6007470). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve. El sustrato colorimétrico S-2288 (Chromogenix, parte n.º 82-0852-39) se diluyó a 900 µM en amortiguador TNH y se agregó a la placa. Las concentraciones finales en los pocillos fueron de 300 µM de S-2288, 1 nM de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante y de 0.015 pM a 222 nM de anticuerpos contra triptasa. Las placas se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación suave y luego se leyeron a A<sub>405</sub>. La concentración inhibitoria máxima media (IC<sub>50</sub>) de los anticuerpos contra triptasa se determinó a partir de un ajuste de cuatro parámetros de sus curvas respectivas. Los clones que demostraran la inhibición deseada se subclonaron luego al limitar la dilución (célula individual/pocillo), se volvieron a evaluar tal como se describió anteriormente y se caracterizaron adicionalmente.
- Se generaron hibridomas de ratón y se cribaron, los clones positivos se analizaron de forma similar. Se inmunizaron tres ratones A/J (Harlan, Indianapolis, Ind.) con proteína triptasa purificada como antígeno (EPC, Inc. #TR913). La triptasa enzimáticamente activa administrada a 20 µg/ratón por inmunización por vía subcutánea e intraperitoneal luego de mezclar y emulsionar 1:1 con adyuvante completo de Freund (primera inmunización) o adyuvante incompleto de Freund (segunda, tercera y cuarta inmunización). El refuerzo (quinta inmunización) no tenía adyuvante. Luego de la cuarta inmunización, se evaluó mediante ELISA el suero de los ratones inmunizados y se seleccionaron los ratones con un título sérico mayor que OD<sub>450</sub> >2.16 en la dilución de 1:1.28 x 10<sup>4</sup> para fusión de hibridoma. Se mezclaron 107 x 10<sup>6</sup> células de bazo aisladas con 100 x 10<sup>6</sup> células de mieloma Sp2/0 (ATCC) para fusión en presencia de polietilenglicol (Sigma-Aldrich, Cat. n.º P7777-5G). Se analizaron veinticuatro clones para detectar su unión a triptasa y se evaluaron para detectar la inhibición de las actividades enzimáticas de la triptasa. Se seleccionó para la humanización el clon T31a (también denominado en la presente “31A” y “mu.31A”).
- (iii) Clonación molecular y reformato de clones de hibridoma contra triptasa de conejo

Se extrajo ARN total de células de hibridoma que producían los anticuerpos monoclonales contra tripsina de conejo (RNeasy® Mini Kit, Qiagen). Mediante el uso del kit de amplificación de ADNc RACE SMARTer® (Clontech), el ARN se transcribió primero de forma inversa, luego se sometió a una síntesis de ADNc de primera cadena y amplificación por PCR RACE 5' de los dominios variable ligero (VL) y variable pesado (VH) con los siguientes cebadores:

Cebador directo de cadena ligera (LC):

Mezcla de cebador universal (kit de amplificación de ADNc RACE SMARTer®, Clontech, n.º de catálogo 634858)

Cebador directo de cadena pesada (HC):

Mezcla de cebador universal (kit de amplificación de ADNc RACE SMARTer®, Clontech, n.º de catálogo 634858)

Cebador inverso de LC:

5'-GATGGTGACTGTTCCAGTTGC-3' (SEQ ID NO: 74)

Cebador inverso de HC:

5'-CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC-3' (SEQ ID NO: 75)

Los cebadores inversos de LC y HC se diseñaron para hibridarse a una región del dominio constante de cadena ligera (CL) y dominio constante de cadena pesada 1 (CH1).

Se secuenciaron directamente los productos amplificados por PCR. La secuencia de ADN de VL identificada se subclonó luego en el vector de expresión de células de mamífero pRK que contenían el dominio constante kappa humano. La secuencia de ADN de VH se insertó en vectores pRK que codifican el dominio constante  $\gamma$ 1 humano de longitud completa.

*(iv) Humanización del anticuerpo monoclonal contra tripsina de conejo E104*

Los dominios de VL (SEQ ID NO: 53) y VH (SEQ ID NO: 52) del anticuerpo monoclonal contra

triptasa de conejo E104 se alinearon con las secuencias de consenso humanas de VL kappa I (VL<sub>KI</sub>) y de VH subgrupo IV (VH<sub>IV</sub>) (SEQ ID NO: 92 y 93, respectivamente). Ver, por ejemplo, Dennis, cap. 2 CDR Repair: A Novel Approach to Antibody Humanization en *Current Trends in Monoclonal Antibody Development and Manufacturing*, eds. Shire et ál. Springer, Nueva York, NY. Las regiones hipervariables (HVR) se modificaron en los marcos aceptores de consenso de VL<sub>KI</sub> y VH<sub>IV</sub> humanas para generar variantes de injerto de CDR. A partir del dominio VL de E104, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en VL<sub>KI</sub>. A partir del dominio VH, las posiciones 26-35b (H1), 50-65 (H2) y 93-102 (H3) se injertaron en VH<sub>IV</sub>. Para evaluar las posiciones de vernier de marco que pueden ser importantes, las posiciones de vernier seleccionadas se mutaron nuevamente en secuencias de conejo. Las posiciones de vernier que se mutaron nuevamente en secuencias de conejo incluyeron las posiciones 2, 4, 43, 68 y 87 en VL y 37, 67, 71, 78 y 91 en VH.

Los dominios de VL y VH del anticuerpo monoclonal contra triptasa de conejo E104 se alinearon también con las secuencias de consenso humanas de VL kappa I (VL<sub>KI</sub>) y de VH subgrupo III (VH<sub>III</sub>) (SEQ ID NO: 92 y 94, respectivamente). Ver Dennis, *supra*. Las regiones hipervariables (HVR) se modificaron en los marcos aceptores de consenso de VL<sub>KI</sub> y VH<sub>III</sub> humanas para generar variantes de injerto de CDR. A partir del dominio VL de rab.E104, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en VL<sub>KI</sub>. A partir del dominio VH, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 93-102 (H3) se injertaron en VH<sub>III</sub>.

En total, se sintetizaron dos versiones distintas de secuencias VL humanizadas y seis versiones distintas de secuencias VH humanizadas y luego se subclonaron en vectores de expresión de mamífero pRK. Al combinar las distintas versiones de la LC y la HC, se generó un total de doce variantes (v1 a v12) distintas de E104 humanizadas (Tabla 3). Todas las variantes contra triptasa humanizadas se expresaron como anticuerpos IgG1 o IgG4 en células de mamífero. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía por afinidad a través de métodos estándar (MabSelect SuRe™; GE Healthcare). Todos los anticuerpos IgG4 utilizados en el apartado de Ejemplos incluyeron una mutación S228P (numeración de EU) en la región constante de cadena pesada; no obstante, la invención descrita en la presente no se limita a la variante IgG4 con la mutación S228P.

Se muestra una secuencia de ADN que codifica el dominio VH de huE104.v2 en la SEQ ID NO: 109. Se muestra una secuencia de ADN que codifica el dominio VL de huE104.v2 en la SEQ ID NO: 110. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada (IgG1) en la SEQ ID NO: 111. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada (IgG4.S228P) en la SEQ ID NO: 113. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera (IgG1 e IgG4) en la SEQ ID NO: 112. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (HC) de huE104.v2 IgG1 en la SEQ ID NO: 80. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera (LC) de huE104.v2 (IgG1 o IgG4) en la SEQ ID NO: 81. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la HC de huE104.v2 IgG4 S228P en la SEQ ID NO: 82.

*(v) Humanización del anticuerpo monoclonal contra tripsina de ratón 31A*

Los dominios de VL (SEQ ID NO: 20) y VH (SEQ ID NO: 19) del anticuerpo monoclonal contra tripsina de ratón 31A ("mu.31A") se alinearon con las secuencias de consenso humanas de VL kappa I (VL<sub>KI</sub>) y de VH subgrupo III (VH<sub>III</sub>) (SEQ ID NO: 92 y 93, respectivamente). Las regiones hipervariables (HVR) se modificaron en los marcos aceptores de consenso de VL<sub>KI</sub> y VH<sub>III</sub> humanas para generar variantes de injerto de CDR. A partir del dominio VL de mu.31A, las posiciones 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) se injertaron en VL<sub>KI</sub>. A partir del dominio VH de mu.31A, las posiciones 26-35 (H1), 50-65 (H2) y 93-102 (H3) se injertaron en VH<sub>III</sub>. Para evaluar la importancia de las posiciones de vernier de marco, las posiciones de vernier seleccionadas se mutaron nuevamente en secuencias de ratón. Las posiciones de vernier que se mutaron nuevamente en secuencias de ratón incluyeron las posiciones 4, 43, 46, 47 y 71 en VL y la posición 49 en VH.

En resumen, se sintetizaron tres LC humanizadas y cinco HC humanizadas y luego se subclonaron en vectores de expresión de mamífero pRK. Al combinar las distintas versiones de la LC y la HC, se generó un total de quince variantes humanizadas (v1 a v15) distintas de 31A ("hu31A") (Tabla 4).

Todas las variantes contra triptasa humanizadas se expresaron como anticuerpos IgG1 o IgG4 en células de mamífero. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía por afinidad a través de métodos estándar (MabSelect SuRe™; GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA).

5

Se muestra una secuencia de ADN que codifica el dominio VH de hu31A.v11 en la SEQ ID NO: 104. Se muestra una secuencia de ADN que codifica el dominio VL de hu31A.v11 en la SEQ ID NO: 105. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada (IgG1) en la SEQ ID NO: 106. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada (IgG4.S228P) en la SEQ ID NO: 108. Se muestra una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera (IgG1 e IgG4) en la SEQ ID NO: 107. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la HC de hu31A.v11 IgG1 en la SEQ ID NO: 76. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la LC de hu31A.v11 IgG1 en la SEQ ID NO: 77. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la HC de hu31A.v11 IgG4 S228P en la SEQ ID NO: 78. Se muestra la secuencia de aminoácidos de la LC de hu31A.v11 IgG4 S228P en la SEQ ID NO: 79.

15

*(vi) Clonación, expresión y purificación de fragmentos Fab*

20

25

30

Los Fab se clonaron y se expresaron en *E. coli* como se describió anteriormente (ver Simmons et ál. *J. Immunol. Methods* 263:133-147, 2002; Lombana et ál. *Sci. Rep.* 5:17488, 2015). Se cosechó una pasta celular de células de *E. coli* que contenía el Fab expresado a partir de fermentaciones que expresaron Fabs y se disolvieron en amortiguador de PBS que contenía EDTA 25 mM y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM. La mezcla se homogeneizó y luego se hizo pasar dos veces a través de un microfluidizador. Luego se centrifugó la suspensión a 21.500 x g durante 60 minutos. Después se cargó el sobrenadante en una columna proteínica G equilibrada con PBS a 5 ml/min. La columna se lavó con amortiguador de PBS hasta un nivel inicial y luego se eluyeron las proteínas con ácido acético al 0.6 %. Se acumularon las fracciones que contenían Fabs analizadas mediante SDS-PAGE y luego se cargaron en una columna SP SEPHAROSE® de 50 mL equilibrada con MES 20 mM (pH 5.5). La columna se lavó con amortiguador MES 20 mM (pH 5.5) para 2 volúmenes de columna y luego se eluyó con un gradiente lineal a NaCl 0.5M en amortiguador MES 20

mM (pH 5.5). Para la purificación final, las fracciones que contenían Fab de la cromatografía de intercambio iónico se concentraron y se colocaron en una columna por exclusión de tamaño S75 en amortiguador de PBS. Se utilizó el mismo protocolo para todos los Fab utilizados en los experimentos.

5

*(vii) Análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) BIAcore® de variantes humanizadas contra triptasa*

En este experimento, todas las variantes humanizadas se expresaron como IgG mediante la transfección transitoria de células 293. La IgG se purificó con cromatografía por afinidad de proteínas G. La afinidad de cada variante para el monómero de triptasa humana beta 1 marcada con His recombinante (SEQ ID NO: 128) se determinó mediante análisis de SPR con un BIAcore® T200. Los chips de sensor CM5 BIAcore® Serie S se inmovilizaron con anticuerpo monoclonal de ratón contra IgG (Fc) humana (kit de captura de anticuerpo humano de GE Healthcare) y se capturaron luego en cada celda de flujo variantes contra triptasa. Se inyectaron diluciones triples en serie del monómero de triptasa humana beta 1 a una velocidad de flujo de 30 µl/min. Cada muestra se analizó con una asociación de 3 min y una disociación de 10 min. Luego de cada inyección, se regeneró el chip mediante el uso de MgCl<sub>2</sub> 3 M. La respuesta de unión se corrigió al restar las unidades de respuesta (RU) de una celda de flujo que capturan una IgG no pertinente a una densidad similar. Se utilizó el modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultáneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para análisis de los parámetros cinéticos.

15

20

*(viii) Análisis de actividad de inhibición de variantes humanizadas contra triptasa*

25 a. Ensayo enzimático de triptasa

30

La inhibición de la actividad de triptasa humana mediante anticuerpos contra triptasa humanizados se midió con un ensayo de actividad de triptasa recombinante. Se diluyó hu31A.v11 IgG4 y hu31a.v11 IgG1 de 0.05 a 100 µg/ml (0.30 a 667 nM) en PBS, pH 7.4, y se diluyó huE104.v2 IgG4 y huE104.v2 IgG1 de 0.02 a 50 µg/ml (0.15 a 333 nM) en PBS pH 7.4. La enzima activa de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante se diluyó a 0.75 nM

en amortiguador TNH (Tris 200 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/mL de heparina, TRITON™ X-100 al 0.01 %, pH 8.0) y anticuerpos contra triptasa combinados 1:1 con placas negras de 384 pocillos (ViewPlate-384 F, negras de fondo transparente, Perkin Elmer, n.º de catálogo 6007470). Se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación leve.

- 5 El sustrato colorimétrico S-2288 (Chromogenix, parte n.º 82-0852-39) se diluyó a 1200 µM en amortiguador TNH y se agregó a la placa. Las concentraciones finales en los pocillos fueron de 400 µM de S-2288, 0.25 nM de tetrámero de triptasa humana beta 1 recombinante, 66 µg/mL de heparina, 0.10 a 222 nM de anticuerpos contra triptasa para hu31A.v11 y 0.05 a 111 nM para huE104.v2. Las placas se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente con  
10 agitación suave y luego se leyeron a  $A_{405}$ . La IC<sub>50</sub> de los anticuerpos contra triptasa se determinó a partir de un ajuste de cuatro parámetros de sus curvas respectivas.

b. Ensayo de proliferación de células de músculo liso bronquial y ensayo de contracción a base de colágeno

15

Se cultivaron células de músculo liso bronquial (BSMC; n.º de catálogo CC-2576, Lonza Minneapolis, MN) en una incubadora humedecida a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio de cultivo completo SmGM-2 (n.º de catálogo CC-3182, Lonza). El medio de ensayo fue medio de cultivo SmGm-2 sin suero humano ni complementos añadidos (n.º de catálogo CC-3181, Lonza). Se  
20 utilizó triptasa humana tetramérica de tipo salvaje o enzima de triptasa catalíticamente inactiva S195A humana (numeración de quimotripsinógeno) a las concentraciones especificadas. Se utilizaron anticuerpos contra triptasa humana hu31A.v11 IgG4 y E104.v2 IgG4 a las concentraciones especificadas.

- 25 Para el ensayo de proliferación, 1 día antes de realizar el ensayo, se colocaron en placas BSMC a  $2 \times 10^5$  células/ml en una placa de cultivo tisular de 96 pocillos (n.º de catálogo 353072, Falcon BD) en medio de cultivo completo. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con medio de ensayo y se incubaron las células durante 24 horas más. Los anticuerpos contra triptasa humana se diluyeron en serie 3.3 veces en medio de ensayo en  
30 una placa de cultivo tisular de 96 placas (n.º de catálogo 353072, Falcon BD). Se transfirieron 100 µL de hu31A.v11 IgG4 a una placa de 96 pocillos que contenía 100 µL de triptasa

humana 200 nM. Se incubaron anticuerpos contra triptasa humana y triptasa activa durante 30 minutos a temperatura ambiente. En este momento, se retiró el medio de ensayo de las células de las placas y se reemplazó con 100  $\mu$ L de los anticuerpos diluidos más triptasa. La concentración final de anticuerpos se encontró en el intervalo de 2.0  $\mu$ M a 4 pM. La

5 concentración final de triptasa fue de 100 nM (sin heparina). La concentración final de sal fue de alrededor de 130 mM. Los pocillos que contenían solo triptasa se incluyeron como controles de estimulación. Los pocillos que contenían solo medio de ensayo se incluyeron como controles sin estimulación. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C antes de

10 agregar 1  $\mu$ Ci de H<sup>3</sup>-timidina por pocillo. Luego de 6 horas más de incubación, se midió la proliferación mediante incorporación de H<sup>3</sup>-timidina. Se cuantificó la radiactividad asociada a células mediante conteo de centelleo. Los resultados se expresaron como el promedio de las muestras triplicadas. Se generaron gráficas y se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el uso de KaleidaGraph (Synergy Software).

15 Para el ensayo de contracción a base de colágeno, 1 un día antes de llevar a cabo el ensayo, se colocaron las BSMC en placas en colágeno a  $9 \times 10^6$  células/mL en una placa de 24 pocillos (n.º de catálogo 353047, Falcon BD) siguiendo las instrucciones del fabricante (n.º de catálogo CBA-201, Cell BioLabs Inc.). Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, las células se superpusieron con 1 mL de medio de ensayo. Luego de 24 horas de incubación a 37 °C, el

20 medio se reemplazó con 250  $\mu$ L de medio de ensayo fresco. Se diluyó triptasa en 250  $\mu$ L de medio de ensayo a 660 nM en presencia o ausencia de 4  $\mu$ M de anticuerpos contra triptasa humana y se incubó durante 30 minutos a 37 °C antes de agregarla a los pocillos especificados que contenían la matriz de célula:colágeno. Las concentraciones finales fueron de 330 nM de triptasa y 2  $\mu$ M de anticuerpo (sin heparina). La concentración final de sal fue de

25 alrededor de 130 mM. La contracción celular se inició mediante la liberación de la matriz de célula:colágeno de la pared de la placa mediante el uso de una punta de pipeta estéril. Se utilizó medio de ensayo solo como control sin estimulación. Al inicio de la contracción celular (t=0), las matrices de célula:colágeno se visualizaron, capturaron y registraron mediante el uso de un AlphaMager® de ProteinSimple. Se incubaron las células a 37 °C durante 3 horas más

30 y se volvieron a capturar y registrar las matrices de célula:colágeno (t=3). Se analizaron los datos mediante el uso del software NIH Image J. Los datos se representaron como el cambio

porcentual del diámetro de la matriz de célula:colágeno desde el inicio de la contracción ( $t=0$ ) hasta el punto temporal de las 3 horas ( $t=3$ ). Los resultados se expresaron como el promedio de las muestras triplicadas.

## 5 c. Ensayo de liberación de histamina de mastocitos

Se utilizó la línea de mastocitos humanos LAD2. Se cultivaron células LAD2 en una incubadora humedecida a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % en medio de crecimiento sin suero, StemPro®-34, que contenía complemento de nutriente StemPro®-34 (n.º de catálogo 10640-019, Gibco/Life Technologies), 1x penicilina-estreptomicina-glutamina (n.º de catálogo 10378-016, Gibco/Life Technologies) y 100 ng/mL de factor de células madres (SCF, por sus siglas en inglés) humano recombinante (n.º de catálogo 573908, BioLegend). Ver Kirshenbaum et ál. *Leukemia Research* 27:677-682, 2003. Se utilizó triptasa humana de tipo salvaje o triptasa humana S195A mutante a las concentraciones específicas. Se obtuvo IgE humana anti-NP (JW8.5.13; ver Jackman et ál. *J. Biol Chem.* 285(27):20850-20859, 2010) de Serotec Inc. Se utilizó NP-BSA (n.º de catálogo N5050H-10, Biosearch Technologies, Petaluma, CA) a la concentración especificada para desencadenar la liberación de histamina. Se utilizaron anticuerpos contra triptasa humana hu31A.v11 IgG4 y E104.v2 IgG4 a las concentraciones especificadas. Se utilizó el inhibidor de moléculas pequeñas G02849855 a la concentración especificada. Las estimulaciones celulares se llevaron a cabo mediante el uso de la sal de Tyrode (n.º de catálogo T-2397, Sigma). Se midió la histamina mediante el uso de un kit de ELISA de histamina (GenWay. n.º de catálogo 40-371-25010).

Para el ensayo de liberación de histamina desencadenado por IgE , se colocaron células LAD2 en placas a  $4 \times 10^6$  células/4 ml en 2 pocillos de una placa de 6 pocillos. Se agregó IgE anti-NP (100 ng/ml) a un pocillo y las células se incubaron durante la noche a 37°C para cebar las células. En el otro pocillo, las células se cultivaron en medio solo sin adición de IgE anti-NP para servir como control negativo. Luego de incubación durante la noche, las células se lavaron 3 veces con medio de cultivo para eliminar la IgE no unida. Se volvieron a suspender las células en 4 mL de sales de Tyrode (densidad celular  $1 \times 10^6$  células/ml) y se separaron en alícuotas en tubos Eppendorf® (300.000 células/tubo). Las muestras se incubaron con 100

5  $\mu\text{g/mL}$  de hu31A.v11 IgG4 o  $10 \mu\text{M}$  de G02849855, se mezclaron completamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego de esta incubación, se agregó NP-BSA a las muestras a una concentración final de  $0.1 \mu\text{g/mL}$  para desencadenar la desgranulación de las células. Las muestras se mezclaron por completo y se incubaron a

10

Para el ensayo de liberación de histamina desencadenada por triptasa humana, se volvieron a suspender células LAD2 en sales de Tyrode a una concentración de  $10^6$  células/mL y se dividieron en alícuotas en tubos Eppendorf® ( $300,000$  células/tubo). Para promover la desgranulación celular, las células se trataron con  $3 \mu\text{g/mL}$  de triptasa (de tipo salvaje o
 15 mutante S195A) o  $3 \mu\text{g/mL}$  de triptasa que se había incubado previamente con  $100 \mu\text{g/mL}$  de hu31A.v11 durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se usó PBS como control sin estimulación. Las muestras se mezclaron por completo y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una incubadora de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora. La concentración final de sal fue de alrededor de  $140 \text{ mM}$ . Luego se centrifugaron las células a  $3000 \text{ rpm}$  durante 5 minutos a temperatura ambiente, y
 20 se recogió el sobrenadante para la medición de histamina. La histamina en el sobrenadante de desgranulación se cuantificó mediante el uso de un kit de ELISA de histamina. Los datos se representaron como el promedio de las muestras duplicadas.

20

#### (ix) Purificación de monómeros y tetrámeros de triptasa recombinante

25

Se expresó la triptasa humana sin el péptido señal endógeno (residuos de aminoácidos 1-15 de la SEQ ID NO:71) y propéptido (residuos de aminoácidos 16-30 de la SEQ ID NO:71) en células CHO de mamífero como una proteína recombinante marcada con His con un sitio de escisión de enterocinasa modificado y se sometió a ultrafiltración 5x seguida por una dilución
 30 5x en PBS. Luego se cargó medio en una columna de Ni-NTA y se eluyó con imidazol  $250 \text{ mM}$ . El eluato se dializó en MOPS  $10 \text{ mM}$ , NaCl  $0.2 \text{ M}$ , amortiguador con pH 6.8 que

30

proporcionó la triptasa monomérica. Los monómeros de triptasa marcados con His6 sin escindir permanecen monoméricos y no forman tetrámeros.

5 Para generar la triptasa tetramérica, se digirió la triptasa monomérica que contenía el marcador His mediante el uso de 0.1 mg/ml de enzima enterocinasa y se estabilizó con sal de sodio de sulfato de dextrano-10 a 0.5 mg/ml durante 16-20 horas a temperatura ambiente. La proteína se hizo pasar a través de una columna SUPERDEX™ 200 hacia el amortiguador final de MOPS 10 mM, NaCl 2 M, pH 6.8 para separar los tetrámeros de los monómeros y de cualquier proteasa contaminante residual. Se muestra un ejemplo de tetrámero purificado en 10 la Figura 3A, pico 1. Se utilizó triptasa tetramérica acumulada para los ensayos de actividad e inmunización.

## *B. Resultados*

### 15 *(i) Clonación de hibridomas*

La clonación molecular de cinco anticuerpos contra triptasa de conejo de clones de hibridoma positivos según ELISA reveló cuatro clones únicos contra triptasa. De estos, el clon E104 20 mostró la actividad de inhibición más potente en el ensayo enzimático, y se seleccionó para una modificación posterior. En paralelo, también se seleccionó para modificación posterior un anticuerpo monoclonal contra triptasa murina 31A que mostró una actividad de inhibición en el ensayo enzimático.

### 25 *(ii) Generación de variantes quiméricas de E104 (chE104)*

La cadena ligera del anticuerpo monoclonal contra triptasa de conejo E104 es una cadena ligera kappa de conejo, que contiene un puente disulfuro entre Cys80 en FR3 del dominio variable (VL) y Cys170 del dominio constante (CL). Para evaluar la importancia de Cys80 en el VL, se generó una variante E104 quimérica con la cisteína en la posición 80 mutada a 30 alanina (Cys80Ala). Tal como se muestra en la Tabla 2, no hubo diferencia entre las dos variantes en términos de rendimiento o acumulación, según se observa mediante el % de

monómeros elevado en las variantes quiméricas Cys80 y Cys80Ala determinadas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Por lo tanto, se determinó que el residuo Cys80 no era fundamental y, en la versión humanizada, Cys80 se cambió a un residuo de prolina como en el injerto de VH4. Además, los anticuerpos E104 quiméricos con la mutación de Cys80Ala en el dominio variable FR3, ya fuera fusionado a los dominios constantes de IgG1 o IgG4 humanos, mostraron actividades de inhibición similares a las del anticuerpo monoclonal de conejo con la cisteína en la posición 80 (no se muestran los datos).

**Tabla 2: Efecto del residuo Cys80 del anticuerpo contra triptasa E104 sobre el rendimiento y la acumulación**

| Clon contra triptasa | Variantes de cadena ligera (residuo de la posición 80) | Rendimiento (mg) | % de monómeros |
|----------------------|--------------------------------------------------------|------------------|----------------|
| E104                 | chE104.C                                               | 3.01             | 95.45          |
|                      | chE104.A                                               | 3.14             | 95.2           |

*(iii) Humanización del clon de anticuerpo monoclonal contra triptasa de conejo E104 y el clon de anticuerpo monoclonal contra triptasa de ratón 31A*

Todas las variantes humanizadas se expresaron como IgG y se evaluaron sus afinidades de unión en un ensayo de SPR BIAcore®. En general, todas las variantes de E104 humanizadas (huE104) mostraron afinidades de unión similares hacia el monómero de triptasa humana beta 1 (Tabla 3). La Tabla 3 enumera variantes de huE104, así como la afinidad de unión (en términos de  $K_D$ ) según se determina mediante análisis de SPR BIAcore®. La Tabla 3 proporciona también las SEQ ID NO de los dominios VH y VL para cada variante. Cada clon de la Tabla 3 se evaluó en formato de IgG1. De manera congruente, se observaron valores de IC50 muy similares para estos anticuerpos en el ensayo de actividad enzimática descrito anteriormente, salvo que los clones huE104.v1 y huE104.v5, y en menor medida, huE104.v11 y huE104.v12, mostraron una medida de “efecto de gancho” (donde se observó un aumento de la actividad enzimática, es decir, una disminución de la actividad de inhibición del

anticuerpo, con concentraciones elevadas de anticuerpo) en el ensayo enzimático. Las modificaciones en la región FR3 de cadena pesada de V71 del anticuerpo humanizado al residuo de Arg original del anticuerpo monoclonal de conejo (V71R) y F78 del anticuerpo humanizado al residuo de Val original del anticuerpo monoclonal de conejo (F78V) eliminaron el efecto de gancho que se observa en E104.v1, v5, v11 y v12. El clon quimérico E104.v9 contiene R71 y V78 como en el Ab monoclonal de conejo original E104. Remitirse a la tabla 3. Tal como se muestra en la Figura 12B, el residuo de arginina (R) en la posición 71 y el residuo de valina (V) en la posición 78 (ambos con numeración de Kabat) pueden desempeñar un papel importante en la conformación de HVR-H2 y, por lo tanto, en la unión del anticuerpo a la triptasa. Como resultado, las modificaciones de V71R y F78V en huE104.v2 pueden haber afectado la conformación del bucle 80 de triptasa, que es importante en la asociación de dos protómeros que forman la interfaz pequeña. Ver el Ejemplo 3 que figura más adelante. Por lo tanto, hu104.v2, que posee las reversiones V71R y F78V, posee una mayor actividad de unión e inhibición en comparación con v1, que posee la V en la posición 71 y F en la posición 78. Todas las variantes a excepción de v1, v5, v11 y v12 mostraron una inhibición completa de la actividad de triptasa según se midió a través del ensayo enzimático descrito anteriormente. El clon humanizado huE104.v2 se seleccionó para evaluación adicional. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de huE104.v2 se muestran en la Figura 1.

**Tabla 3: Afinidades de unión de variantes de E104 humanizado (huE104) (afinidad de unión al monómero de tripsina humana b1 en paréntesis)**

|               |                                                               | Cadena ligera                 |                                                               |                                    |
|---------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|               |                                                               | Injerto K1<br>(SEQ ID NO: 37) | Injerto K1<br>+A2 +L4<br>+P43 +E68<br>+F87<br>(SEQ ID NO: 58) | LC<br>quimérica<br>(SEQ ID NO: 59) |
| Cadena pesada | Injerto VH4<br>(SEQ ID NO: 47)                                | v1 (0.43 nM)                  | v5 (0.18 nM)                                                  | --                                 |
|               | Injerto VH4 +R71<br>+V78<br>(SEQ ID NO: 36)                   | v2 (0.18 nM)                  | v6 (0.14 nM)                                                  | v10 (0.26 nM)                      |
|               | Injerto VH4<br>+V37 +S67 +R71<br>+V78 +F91<br>(SEQ ID NO: 48) | v3 (0.21 nM)                  | v7 (0.25 nM)                                                  | --                                 |
|               | Injerto VH3<br>+I48 +S67 +T73<br>+V78<br>(SEQ ID NO: 51)      | v4 (0.44 nM)                  | v8 (0.24 nM)                                                  | --                                 |
|               | HC quimérica<br>(SEQ ID NO: 52)                               | v9 (0.24 nM)                  | --                                                            | --                                 |
|               | Injerto VH4 +V78<br>(SEQ ID NO: 49)                           | v11 (0.32 nM)                 | --                                                            | --                                 |
|               | Injerto VH4 +R71<br>(SEQ ID NO: 50)                           | v12 (0.12 nM)                 | --                                                            | --                                 |

La Tabla 4 enumera variantes de hu31A, así como la afinidad de unión (en términos de  $K_D$  nanomolar) según se mide a través de análisis de SPR BIAcore®. La Tabla 4 muestra también las SEQ ID NO del VH y VL para cada anticuerpo. Todas las variantes mostraron una

inhibición completa de la actividad de tripsina según se midió a través del ensayo enzimático (no se muestran los datos). Cada clon de la Tabla 4 se evaluó en formato de IgG1. El clon hu31A.v11 mostró la mejor afinidad y la mejor actividad de inhibición en un ensayo enzimático y, por lo tanto, se seleccionó para una evaluación posterior. Las secuencias de aminoácidos de los dominios variables de cadena pesada y ligera de hu31A.v11 se muestran en la Figura 1.

**Tabla 4: Afinidades de unión de variantes de 31A humanizado (hu31A) (afinidad de unión al monómero de tripsina humana b1 en paréntesis)**

|                          |                                                              | Cadena ligera                  |                                                    |                                                               |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|                          |                                                              | Injerto K1<br>(SEQ ID NO: 102) | Injerto K1<br>+S43 +P46<br>+W47<br>(SEQ ID NO: 10) | Injerto K1<br>+ L4 +S43 +P46<br>+W47 +Y71<br>(SEQ ID NO: 103) |
| Caden<br>a<br>pesad<br>a | Injerto VH3<br>(SEQ ID NO: 98)                               | v1 (4.04 nM)                   | v2 (0.74 nM)                                       | v3 (0.79 nM)                                                  |
|                          | Injerto VH3 +A49<br>(SEQ ID NO: 99)                          | v4 (11.8 nM)                   | v5 (1.68 nM)                                       | v6 (1.65 nM)                                                  |
|                          | Injerto VH3<br>+S31 +F32 +H35<br>+A49<br>(SEQ ID NO: 100)    | v7 (2.06 nM)                   | v8 (0.94 nM)                                       | v9 (0.94 nM)                                                  |
|                          | Injerto VH3 +A49<br>+T93 +N96 +Y97<br>+D98<br>(SEQ ID NO: 9) | v10 (1.19 nM)                  | v11 (0.40 nM)                                      | v12 (0.43 nM)                                                 |
|                          | Injerto VH3 +A49<br>+T93<br>(SEQ ID NO: 101)                 | v13 (9.65 nM)                  | v14 (1.34 nM)                                      | v15 (1.32 nM)                                                 |

La actividad de inhibición de los anticuerpos contra tripsina humanizados también se

determinó mediante el uso del ensayo de actividad enzimática de triptasa recombinante descrito anteriormente. Tanto h31A.v11 como huE104.v2, IgG1 e IgG4 inhibieron completamente la actividad de triptasa en el ensayo enzimático (ver la Figura 2A). Se muestran a continuación los valores de IC50 (Tabla 5).

**Tabla 5: Actividad de inhibición (IC50) de anticuerpos contra triptasa humanizados**

| Anticuerpo | IgG1           | IgG4           |
|------------|----------------|----------------|
| hu31A.v11  | 1.82 nM ± 0.09 | 3.9 nM ± 0.65  |
| huE104.v2  | 0.91 nM ± 0.35 | 0.59 nM ± 0.11 |

Tanto hu31A.v11 como huE104.v2 se unen e inhiben la triptasa humana beta 2 y beta 3, además de la triptasa beta 1. Se muestran a continuación en la Tabla 6 datos representativos en función de protocolos descritos anteriormente para el análisis de afinidad y ensayo enzimático con triptasa humana beta 1 como objetivo. Tanto hu31A.v11 como huE104.v2 también se unen a la triptasa de cyno D1 y la inhiben.

**Tabla 6: Afinidad e IC50 de anticuerpos contra triptasa humanizados**

| Anticuerpo        | Triptasa humana | K <sub>D</sub> (nM) | IC50 (nM) |
|-------------------|-----------------|---------------------|-----------|
| hu31A.v11<br>IgG4 | Triptasa beta 1 | 0.27                | 3.16      |
|                   | Triptasa beta 2 | 0.12                | 1.46      |
|                   | Triptasa beta 3 | 0.10                | 2.47      |
| huE104.v2<br>IgG4 | Triptasa beta 1 | 0.3                 | 0.42      |
|                   | Triptasa beta 2 | 0.18                | 0.95      |
|                   | Triptasa beta 3 | 0.13                | 2.80      |

La actividad de inhibición de hu31A.v11 IgG4 o huE104.v2 IgG4 se evaluó posteriormente en varios modelos *ex vivo* de la función de células del músculo liso (SMC) de vías aéreas primarias humanas. La adición de triptasa beta 1 al medio de cultivo produce un aumento de la proliferación de las SMC de las vías aéreas primarias humanas (Figura 2B), así como la

contracción de las células (Figura 2C). La adición de hu31A.v11 o huE104.v2 produjo una reducción dependiente de la dosis de la proliferación, y a 300 µg/ml inhibió a niveles iniciales (Figura 2B). De manera similar, la adición de hu31A.v11 o huE104.v2 redujo la contracción a niveles iniciales (Figura 2C). Estos datos demuestran que los anticuerpos contra triptasa hu31A.v11 y huE104.v2 inhibieron la función de la triptasa.

La adición de triptasa o IgE a mastocitos produce la desgranulación y liberación de histamina (Figuras 2D-2E). Se evaluó la capacidad de hu31A.v11 de inhibir la liberación de histamina. La triptasa beta 1 con la sustitución S195A es catalíticamente inactiva. La adición de hu31A.v11 bloqueó la capacidad de la triptasa de promover la liberación de histamina (Figuras 2D-2E). El grado de inhibición (30-50 %) fue similar al inhibidor de molécula pequeña de la actividad de triptasa beta 1, G02849855 (Figura 2E). Estos resultados muestran además que el anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 inhibe la función de triptasa.

## **Ejemplo 2: hu31A.v11 y huE104.v2 IgG disocian el tetrámero de triptasa humana beta**

La estructura cristalina de la triptasa tetramérica activa muestra que el sitio catalítico de cada protómero (representado por S195, H57 y D102 de cada protómero, numeración de quimotripsinógeno) se encuentra dentro del poro del tetrámero, y que el acceso a los sitios activos está limitado de forma tal que solo pueden acceder los sustratos de péptido y moléculas pequeñas (Pereira et ál. *Nature* 392:306-11, 1999). A la fecha, no se conoce que los inhibidores de proteasa de serina de mamífero inhiban la actividad proteolítica de la triptasa. Los inhibidores de proteasa de serina humana con arquitectura de tipo dominio de Kunitz son demasiado grandes como para acceder a los sitios activos. No se conocen inhibidores naturales de triptasa en seres humanos. Los únicos inhibidores macromoleculares naturales conocidos de la triptasa a la fecha son inhibidores de triptasa derivados de sanguijuelas (LDTI) (Sommerhoff et ál. *Biol. Chem.* 373:685-94, 1997) e inhibidor de proteasa derivado de garrapatas (TdPI) (Paesen et ál. *J. Mol. Biol.* 368:1172-86, 2007). LDTI (4.7 kDa) y TdPI (11.1 kDa) poseen la capacidad de bloquea dos o tres de los cuatro sitios activos del tetrámero de triptasa, respectivamente. LDTI y TdPI no disocian el tetrámero de triptasa. Tanto la IgG como Fab de hu31A.v11 tienen un tamaño mucho mayor que LDTI o TdPI, y aun

así inhiben por completo la triptasa.

Se determinó la estequiometría de la unión de Fab hu31A.v11 a la triptasa tetramérica en solución. La triptasa beta 1 tetramérica activa se mezcló con un exceso molar doble de Fab hu31A.v11 a cada protómero y se dejó que la formación del complejo alcanzara un equilibrio. Debido a que el tetrámero se ensambla de forma no covalente, el efecto disociante de cada anticuerpo en la estructura tetramérica se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y se determinaron los tiempos de retención/volúmenes y los pesos moleculares de los picos de proteína individuales. Las fracciones que contienen proteína se caracterizaron mediante SDS-PAGE para determinar los componentes proteínicos (Figura 3A). El tiempo de retención de la triptasa tetramérica por sí sola fue significativamente menor ( $t_r = 26$  min, ejecución 1, pico 1) que cuando se encontraba en complejo con Fab hu31A.v11 ( $t_r = 28.1$  min, ejecución 3, pico 3). Se llevó a cabo un análisis de SEC adicional junto con dispersión de luz en múltiples ángulos (MALS, por sus siglas en inglés) para determinar el peso molecular de los complejos proteínicos eluidos. La triptasa tetramérica poseía un peso molecular de 120 kDa  $\pm$  0.2 % de acuerdo con MALS, que es congruente con el peso molecular teórico de 109.537 kDa en función de la secuencia de aminoácidos (que excluye la glicosilación). El pico de proteína que contiene triptasa en complejo con Fab hu31A.v11 fue de 67.7 kDa  $\pm$  3 % con MALS (pico 3), lo que refleja un complejo que comprende 1 monómero de triptasa unido a 1 Fab. Esto indica que el tetrámero de triptasa se disocia en monómeros tras la unión a Fab hu31A.v11, lo que se corrobora adicionalmente mediante la estructura cristalina (ver Ejemplo 3) y la actividad de inhibición del Fab de hu31A.v11.

Cuando se analizó el mismo complejo de triptasa tetramérica/Fab hu31A.v11 mediante SEC en amortiguador de ensayo enzimático que contenía una concentración elevada de heparina, por ejemplo, 100  $\mu$ g/ml de heparina (ejecución 2), el tiempo de retención del complejo de triptasa-Fab disminuyó apenas ligeramente de 28.1 min (ejecución 3, pico 3) a 27.6 min (ejecución 2, pico 2), probablemente debido a la unión de heparina al complejo proteínico del monómero de triptasa y Fab. La heparina de la mucosa intestinal porcina es una mezcla de cadenas polianiónicas que poseen pesos moleculares dentro del intervalo de 6 a 30 kDa, donde la mayoría de las cadenas se encuentran en el intervalo de 17 a 19 kDa. Este resultado

indica que el efecto estabilizante de la heparina sobre la triptasa tetramérica también se neutraliza o se altera mediante Fab hu31A.v11; incluso una concentración elevada de 100 µg/ml de heparina no puede evitar que Fab hu31A.v11 disocie el tetrámero por completo. Ver la Figura 3A.

5

También se determinó la estequiometría de unión de los Fabs de huE104.v1 y huE104.v2 a la triptasa tetramérica en solución. La triptasa tetramérica activa se mezcló con un exceso molar doble de Fab a cada protómero y se dejó que la formación del complejo alcanzara un equilibrio. La mezcla de complejo resultante se separó mediante SEC con amortiguador de  
10 SEC de triptasa sin heparina y se determinaron los tiempos de retención/volúmenes y los pesos moleculares de los picos de proteína individuales). Las fracciones que contienen proteína se caracterizaron mediante SDS-PAGE para determinar los componentes proteínicos (no se muestran los datos). La triptasa tetramérica WT poseía un tiempo de retención de  $t_r = 26$  min (ver, por ejemplo, pico 1 de la Figura 3A) y un peso molecular de  $120 \text{ kDa} \pm 0.2 \%$  de  
15 acuerdo con MALS, que es congruente con el peso molecular teórico de  $109.537 \text{ kDa}$  en función de la secuencia de aminoácidos (que excluye la glicosilación).

Los Fabs de huE104.v1 formaron un complejo homogéneo con la triptasa tetramérica WT con un tiempo de retención de  $t_r = 21.6 \text{ mL}$  y un peso molecular de  $276.1 \text{ kDa}$ , según se determina  
20 mediante SEC-MALS (no se muestran los datos). Esto representaría un complejo de tetrámero de triptasa con 4 Fabs unidos a este. El análisis SDS-PAGE de las fracciones de este pico confirmaron la presencia de Fabs y protómeros de triptasa. Por lo tanto, los Fabs de huE104.v1 formaron un complejo estable con triptasa tetramérica y no afectaron la estabilidad del tetrámero (no se muestran los datos).

25

La triptasa monomérica marcada con His6 (Figura 3B, ejecución 1) o triptasa tetramérica WT (Figura 3B, ejecución 2) se mezcló con exceso molar doble de huE104.v2 Fab y cada mezcla de complejo se analizó de forma individual mediante SEC. El primer pico de proteína de cada cromatograma tuvo un tiempo de retención  $t_r = 25.8 \text{ min}$  (Figura 2B, ejecución 1, pico 2) y  $t_r =$   
30  $26 \text{ min}$  (Figura 2B, ejecución 2, pico 3), respectivamente. El análisis SDS-PAGE de fracciones de estos dos primeros picos mostró que se encontraba presente en este pico tanto triptasa

como E104.v2 Fab. También se analizaron ambos picos de proteína mediante MALS y se determinó un peso molecular de  $68 \text{ kDa} \pm 3 \%$ , que refleja un complejo que comprende 1 monómero de triptasa unido a 1 Fab. El segundo pico de cada ejecución tuvo un tiempo de retención  $t_r=31.6 \text{ min}$  (ejecución 1, pico 6) y  $t_r=31.8$  (ejecución 2, pico 7), respectivamente, y

5 contuvo solamente Fab huE104.v2, según se determina mediante SDS-PAGE. Los cromatogramas de ambas ejecuciones de SEC prácticamente se superpusieron, lo que indica que la unión a huE104.v2 Fab disocia la triptasa tetramérica WT en monómeros, dado que los tiempos de retención fueron prácticamente idénticos, independientemente de si se utilizó triptasa tetramérica o triptasa monomérica marcada con His para la formación de complejos.

10

Cuando se mezcló nuevamente la triptasa tetramérica con exceso de huE104.v2 Fab en presencia de  $100 \mu\text{g/mL}$  de heparina y se analizó mediante SEC en amortiguador de TNH como amortiguador de ejecución (ejecución 3), se observaron 3 picos de proteína: el primer pico posee un tiempo de retención mucho menor ( $t_r= 21 \text{ min}$ , Figura 3B, ejecución 3, pico 1)

15 que la triptasa tetramérica WT sola ( $t_r= 26 \text{ min}$ , por ejemplo, Figura 3A, pico 1). El segundo pico posee un tiempo de retención de  $t_r= 27.2 \text{ min}$  (Figura 3B, ejecución 3, pico 4) y el último posee un tiempo de retención de  $t_r= 31.2 \text{ min}$  (Figura 3B, ejecución 3, pico 5), lo que indica Fab solo. El análisis SDS-PAGE mostro que tanto triptasa y Fab se hallaban presentes en los picos 1 y 4, donde el pico 1 contiene el tetrámero activo unido por huE104.v2 Fab, y el pico 4

20 contiene monómero de triptasa unido por huE104.v2 Fab (no se muestran los datos). Esto llevó a la conclusión de que, en presencia de una concentración elevada de  $100 \mu\text{g/mL}$  de heparina, solamente se disoció una fracción de triptasa tetramérica mediante huE104.v2 Fab como en el pico 4, mientras que la mayoría de la triptasa permaneció como triptasa tetramérica unida a hu104.v2 Fab en el pico 1. En resumen, huE104.v1 Fab no mostró

25 ninguna actividad de inhibición detectable, mientras que huE104.v2 Fab disoció por completo el tetrámero de triptasa. No obstante, a diferencia de hu31A.v11 Fab o huE104.v2 IgG, la capacidad de huE104.v2 Fab de disociar el tetrámero se neutralizó parcialmente debido a la concentración elevada de heparina. Por lo tanto, en función de estos datos, se concluye que hu31A.v11 Fab puede disociar el tetrámero de triptasa con o sin una concentración elevada

30 de heparina, y que huE104.v2 Fab puede disociar el tetrámero de triptasa en ausencia de una concentración elevada de heparina.

- Cada monómero de triptasa posee un conjunto idéntico de triadas catalíticas y los cuatro monómeros se ensamblan para formar un tetrámero con los cuatro sitios catalíticos orientados hacia el poro central en el cual ingresa el sustrato. Ver Pereira et ál., *supra*. Pereira et ál.
- 5 tratan el diseño de inhibidores de triptasa de molécula pequeña mediante el bloqueo de los sitios activos. Se ha interrumpido el desarrollo de varios inhibidores de triptasa de molécula pequeña debido a una selectividad deficiente o una biodisponibilidad deficiente. Ver, por ejemplo, Cairns, J.A., 2005, *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 18:55-66.
- 10 La triptasa tetramérica de tipo salvaje no se mantiene unida de forma covalente y puede disociarse en monómeros en condiciones fisiológicas (Schwartz et ál. *J. Biol. Chem.* 261:7372-7370, 1986; Alter et ál. *Biochem. J.* 248:821-827, 1987; Schwartz et ál. *J. Immunol.* 144:2304-2311, 1990). Se ha informado que la triptasa madura demuestra una actividad enzimática elevada como tetrámero y es inactiva como monómero en condiciones
- 15 fisiológicamente relevantes (Schwartz et ál., *J. Biol. Chem.* 261:7372-7379, 1986). Los datos que se muestran en la presente demuestran que tanto hu31.v11 como huE104.v2 se unen a monómeros de triptasa, disocian el tetrámero en monómeros al menos a una concentración baja de heparina y, luego de la disociación, permanecen unidos a los monómeros. También se ha informado que la triptasa monomérica puede ser enzimáticamente activa en determinadas
- 20 condiciones (Fukuoka et ál. *J. Immunol.* 176:3165, 2006; Fajardo et ál., 2003, *Biochem. J.* 369:603-610). Las observaciones plantean la pregunta de si un anticuerpo contra triptasa de disociación será inferior a un inhibidor de bloqueo del sitio activo tal como un anticuerpo de bloqueo del sitio activo estabilizante del tetrámero, porque el monómero inactivo en suero puede actuar como captura para los anticuerpos disociantes que se unen a los monómeros.
- 25 Un anticuerpo de bloqueo del sitio activo estabilizante de tetrámeros puede ser más favorable como agente terapéutico si los monómeros pueden ser enzimáticamente activos en determinadas condiciones.
- Primero se investigó la eficacia de un anticuerpo de disociación de tetrámeros en comparación
- 30 con un anticuerpo neutralizante de estabilización de tetrámeros en experimentos *in silico* mediante el uso de un modelo farmacocinético-farmacodinámico (PKPD). El modelo se

desarrolló en software Simbiology® (Mathworks Inc, Cambridge MA) para estimular la generación, disociación y depuración de triptasa tetramérica en el tejido pulmonar y circulante, así como la PK y efectos de unión de los anticuerpos contra triptasa. Se consideran dos tipos de anticuerpos: (1) un anticuerpo de disociación que disocia el tetrámero rápidamente luego de la unión, pero también se une al monómero; y (2) un anticuerpo específico del tetrámero estabilizante, que se une solamente al tetrámero activo y neutraliza su actividad al bloquear el acceso a sus sustratos, pero también extiende la semivida del tetrámero. Se simuló un anticuerpo de disociación de tetrámeros con una  $K_D$  de 0.2 nM con un régimen de dosificación hipotético de 300 mg administrados por vía subcutánea cada cuatro semanas. Se asume un coeficiente de separación pulmonar de 10 % del anticuerpo. Para el caso inicial, se asumen 4 ng/ml de triptasa total en el suero y 10 ng/ml de triptasa total en el compartimiento de tejido; para el caso de triptasa elevada, se asumen niveles de 10 ng/ml de triptasa en suero y 40 ng/ml de triptasa en tejido. Las constantes de velocidad relativas para la disociación tetramérica fisiológica en monómeros y la depuración de cada especie producen una relación 8:1 de monómero con respecto a tetrámero dentro de las acumulaciones de triptasa total.

Para el régimen de dosificación simulado de 300 mg sc q4w de anticuerpos disociantes o estabilizantes, los paneles izquierdos de la Figura 4A muestran la concentración de anticuerpo de anticuerpo total y anticuerpo libre/no unido en el pulmón en el caso inicial, y los paneles derechos muestran los niveles de triptasa en pulmón (libre) correspondientes con respecto a los niveles antes del tratamiento para monómero y tetrámero. Los resultados sugieren que, para un anticuerpo disociante con  $K_D=0.2$ nM (paneles superiores), la mayoría del anticuerpo en los pulmones permanece libre (panel superior izquierdo), lo que indica una disponibilidad adecuada del fármaco a pesar de unirse al monómero y al tetrámero; los resultados indican además que el anticuerpo disociante lograría una reducción sostenida mayor que 90 % de la triptasa tetramérica (activa) (panel superior derecho). Para el anticuerpo estabilizante (paneles inferiores), casi todo el anticuerpo está libre (panel inferior izquierdo); no obstante, la reducción del tetrámero se mantiene solamente en 80 % o por encima.

Debido a que la especificidad para el tetrámero del anticuerpo estabilizante podría considerarse favorable en condiciones de triptasa total elevada, estas simulaciones se

reptieron en el caso de triptasa elevada (Figura 4B). En estas condiciones, se une más anticuerpo disociante a la triptasa monomérica inactiva, lo que produce una cantidad menor de anticuerpo libre (comparar panel superior izquierdo de la Figura 4B con el de la Figura 4A) y lleva a una neutralización de tetrámeros menor, pero igualmente buena (mínimo ~80 %) con el anticuerpo disociante (Figura 4B, panel superior derecho). En comparación, para el anticuerpo estabilizante del tetrámero, a pesar de una cantidad mayor de anticuerpo libre debido a la ausencia de unión al monómero (Figura 4B, panel inferior izquierdo), el anticuerpo logra una neutralización menor (mínimo ~70 %) en comparación con el anticuerpo disociante en las mismas condiciones, a pesar de una afinidad 10 veces mayor asumida para el anticuerpo estabilizante ( $K_D=0.02\text{nM}$ ) en las estimulaciones (Figura 4B, panel inferior derecho). La neutralización menor se debe a una estabilidad mayor (semivida) del objetivo unido que sirve como “depósito” del tetrámero. Por lo tanto, nuestras simulaciones predicen que un anticuerpo disociante es prometedor y tendría un mejor rendimiento que el anticuerpo estabilizante específico para tetrámeros en los distintos casos evaluados.

Luego se evaluó cómo se compara el anticuerpo disociante con el anticuerpo estabilizante específico para tetrámeros con distintas dosis de anticuerpo. La Figura 4C muestra la neutralización de tetrámeros para ambos tipos de anticuerpos, tanto en el caso inicial como de triptasa elevada, en función del nivel de dosificación del anticuerpo (30, 100, 300mg sc q4w). En el caso inicial (Figura 4C, paneles izquierdos), el anticuerpo disociante reduce de forma congruente la actividad de tetrámeros más que el anticuerpo estabilizante, en todas las dosis consideradas. En el caso de triptasa elevada (Figura 4C, paneles derechos), el anticuerpo disociante supera al anticuerpo estabilizante con respecto a la neutralización de tetrámeros en todas las dosis menos la más baja (30 mg), y en este punto los dos anticuerpos tienen un rendimiento comparable. La neutralización generalmente menor lograda mediante el uso del anticuerpo estabilizante a pesar de una afinidad 10 veces mayor ( $K_D=0.02\text{ nM}$ ) que el anticuerpo disociante ( $K_D=0.2\text{nM}$ ) indica un requisito de afinidad mucho mayor (>10x) para una neutralización de tetrámeros comparable mediante el uso del anticuerpo estabilizante en comparación con el anticuerpo disociante. Para ambos casos, la dosis óptima para la neutralización de tetrámeros (90 %) es menor para el anticuerpo disociante que para el anticuerpo estabilizante (no se muestran los resultados), a pesar de la afinidad 10 veces

mayor asumida para el anticuerpo estabilizante. Por lo tanto, de conformidad con el modelo, el anticuerpo disociante superaría o al menos coincidiría con el anticuerpo estabilizante que posee una afinidad 10 veces mayor, en el intervalo de dosis y las concentraciones de triptasa en suero y pulmones evaluadas. Además, se demuestra en la presente que hu31A.v11 y huE104.v2 IgG inhibieron por completo la actividad de triptasa. Ver la Figura 2A y la Tabla 5.

Hasta donde se sabe, no ha habido ningún ejemplo de anticuerpo disociante de tetrámero de triptasa desarrollado para usos terapéuticos. Se conoce que los locus inflamatorios de los tejidos afectados que incluyen pulmones con asma grave son ácidos en comparación con sujetos de control; ver, por ejemplo, Hunt et ál. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:694-699, 2000; Steen et ál. *J. Neuroscience* 15:3982, 1995; Bellocq et ál. *J. Biol. Chem.* 273:5086, 1998; y Lardner *J. Leukocyte Biol.* 69:522, 2001). Los datos publicados muestran que el anticuerpo contra triptasa monoclonal murina B12 neutraliza la triptasa humana beta a un pH neutro pero no puede neutralizar la actividad de triptasa humana beta en un ensayo enzimático a pH 6 ácido (ver Fukuoka et ál. *J. Immunol.* 176:3165, 2006). Por lo tanto, se evaluaron los anticuerpos hu31a.v11 y huE104.v2 para determinar su capacidad de inhibir la actividad de triptasa humana beta en la escisión de fibrinógenos tanto a pH neutro como pH ácido.

En resumen, el tetrámero de triptasa humana beta (1.0 µg/mL) se preincubó con el anticuerpo analizado durante 30 minutos en amortiguador de TNH a pH 6.0 o 7.5 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, 0.1 mg/ml de heparina) a temperatura ambiente. La mezcla se incubó luego con 5 µg de sustrato de fibrinógeno humano (Haematologic Technologies, Inc., n.º de catálogo HIC-0150R) durante 2.5 horas a 37 °C. Cada uno de hu31A.v11 Fab, huE104.v2 Fab y B12 mIgG1 se evaluó a 200 µg/mL. Los productos de escisión se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción con azul Coomassie.

Tal como se muestra en las Figuras 5A y 5B, la triptasa humana beta 1 escindió las cadenas alfa y beta de fibrinógeno a pH 6 y 7.5 (comparar carril 1, fibrinógeno solo, con carril 2, fibrinógeno más triptasa beta 1). El anticuerpo hu31A.v11 Fab inhibió la triptasa humana beta a pH 6 y pH 7.5 (carril 3), mientras que huE104.v2 Fab, en la condición de ensayo de 0.1

mg/ml de concentración elevada de heparina, no lo hizo (carril 5). El carril 6 fue B12 mIgG1 sola. La disminución de la cadena alfa de fibrinógeno indica una actividad proteolítica de la triptasa. La cadena beta de fibrinógeno también se escinde, pero la escisión de la cadena beta tiende a oscurecerse en el gel. Por lo tanto, se cuantificó la intensidad de la cadena alfa y se muestra en los paneles inferiores de las Figuras 5A y 5B. Por lo tanto, hu31A.v11 Fab inhibió la actividad de triptasa a pH 6 y 7.5, mientras que huE104.v2 Fab, en la condición de ensayo de concentración de heparina elevada, no fue inhibidor.

También se evaluó la actividad de inhibición de los anticuerpos de formato IgG (hu31A.v11 IgG4 y huE104.v2 IgG4) mediante el uso del péptido S-2288 como sustrato en un ensayo de inhibición en presencia de triptasa 1 nM y S-2288 cromogénico 400  $\mu$ M en amortiguador de TNH a pH 6, 7 u 8. La concentración final de heparina en este experimento fue de alrededor de 95  $\mu$ g/ml. Tanto hu31A.v11 como huE104.v2 en el formato IgG inhibieron por completo la actividad de triptasa a pH 6, 7 y 8 (no se muestran los datos).

Por lo tanto, tanto hu31A.v11 IgG como huE104.v2 IgG se unen a la triptasa con afinidad elevada y también inhiben de forma eficaz la actividad de triptasa en condiciones fisiológicamente relevantes para trastornos asociados con triptasa, tales como asma. De forma interesante, en estas condiciones experimentales, el anticuerpo contra triptasa humana monoclonal B12 IgG1 también mostró la inhibición de triptasa humana beta a pH 6 (Figura 5A, carril 4), en contraposición con los resultados publicados. La discrepancia puede atribuirse a cualquier actividad de proteasa que no sea triptasa residual presente en el material utilizado para el ensayo en los datos publicados que se activó con el pH ácido y es resistente a la inhibición de B12.

### **Ejemplo 3: Análisis estructural de anticuerpos contra triptasa**

#### *A. Anticuerpos de la familia 31A*

##### *(i). Cristalografía de rayos X*

Se mezcló triptasa tetramérica de tipo salvaje con un exceso molar de 1.5 veces de Fab hu31A.v11 y exceso molar doble de inhibidor de tripsina de soja (STI) (Roche) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó STI para facilitar la cristalización. La mezcla se sometió luego a SEC mediante el uso de una columna S200 (GE Healthcare) en MOPS 10 mM (pH 6.8), NaCl 0.5 M. Se acumularon las fracciones que contenían el complejo ternario de triptasa, STI y Fab hu31A.v11 y se concentraron a 40 mg/mL.

Los cristales de triptasa/Fab hu31A.v11/STI se cultivaron a 19 °C mediante el uso del método de difusión de vapor de gotas colgantes. Se mezcló un amortiguador de cristalización que contenía Tris 0.1 M (pH 7.5), sulfato de litio 0.2 M y polietilenglicol (PEG) 4000 al 5 % en igual volumen con la solución de proteína. Los cristales se bañaron en licor madre artificial que contenía etilenglicol al 25 % y se vitrificaron en nitrógeno líquido.

La Tabla 7 muestra información de ajuste y recabación de datos de rayos X para la estructura de Fab hu31A.v11/triptasa/STI. Se recabaron datos de difracción que se extendieron hasta 2.15 Å en una red cristalina hexagonal en ALS Beamline 5.0.2. La escalación y reducción de datos permitió la asignación de la clase Laue a 6/mmm (Otwinowski, *Methods in Enzymol.* 276, 307-326, 1997; Winn et ál. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 67, 235-242, 2011). En función del volumen de células unitarias y contenido de proteína propuesto, se esperó un complejo de Fab hu31A.v11/triptasa/STI individual en la unidad asimétrica cristalográfica. La estructura se resolvió mediante el uso de reemplazo molecular (McCoy et ál. *J. Appl. Crystallogr.* 40:658-674, 2007) en el grupo espacial P6<sub>2</sub>22. Se utilizaron las siguientes sondas de búsqueda, cada una como cuerpo separado: un protómero de triptasa determinado anteriormente derivado del acceso a PDB 4A6L (Liang et ál. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22:1049-1054, 2012), STI de PDB 1AVU (Song et ál. *J. Mol. Biol.* 275:347-363, 1998), un fragmento Fv sin bucles de CDR de PDB 1FVC (Eigenbrot et ál. *J. Mol. Biol.* 229:969-995, 1993) y la región constante de PDB 1FVD. Luego de un ajuste limitado (Murshudov et ál. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 67:355-367, 2011), los mapas de densidad de electrones permitieron la corrección de la secuencia de proteína de Fab y el ajuste de residuos faltantes y cadenas laterales en densidad clara (Emsley et ál. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 66:486-501, 2010). Se agregaron aguas de forma automática (Adams et ál. *Acta Crystallogr.*

*Sect. D-Biol. Crystallogr.* 66:213-221, 2010). Más rondas de ajustes y perfeccionamiento del modelo (software BUSTER; Global Phasing Ltd., 2011) llevaron al modelo final. El modelo es continuo para los residuos de triptasa Ile16 - Lys244 (numeración de quimotripsinógeno), residuos de STI Asp1 - Asp177, residuos de cadena ligera de Fab Asp1 - Cys214 (numeración de Kabat) (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. Bethesda, MD, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1991). La cadena pesada de Fab es continua a excepción de un espacio de cinco residuos de aminoácidos en el dominio constante. El valor de la estadística de complementariedad de forma ( $Sc$ ) (Lawrence et ál. *J. Mol. Biol.* 234:946-950, 1993) es 0.73, lo que coincide con otros complejos de unión estrecha de Fab/antígeno. El área de contacto entre proteínas más extensa es aquella entre la triptasa y STI, dado que cada una de estas pierde 1260 Å<sup>2</sup> de superficie accesible al solvente (Broger C, xsae, F. Hoffman-La Roche, Basel, Suiza, 2000) en su interfaz. Por el contrario, el contacto de Fab/triptasa es solamente de 760 Å<sup>2</sup> en cada lado, distribuidos de forma pareja entre la cadena pesada y la cadena ligera del Fab. Los contactos de la estructura cristalina de 4 Å o menores se distribuyen alrededor de STI, triptasa y los cuatros dominios de Fab, e incluyen varios enlaces de hidrógeno, así como contactos hidrofóbicos.

**Tabla 7: Recabación y ajuste de datos de rayos X de Fab hu31A.v11/triptasa/STI**

|    |                                  |                          |
|----|----------------------------------|--------------------------|
| 5  | <b>Reducción de datos</b>        |                          |
|    | Fuente de rayos X                | ALS 5.0.2                |
|    | Longitud de onda (Å)             | 0.97395                  |
|    | Intervalo de resolución (Å)      | 31,48-2,15 (2,226-2,149) |
|    | Grupo espacial                   | P <sub>6</sub> 222       |
| 10 | Bordes de células unitarias (Å)  | 128,52 128,52 245,88     |
|    | Ángulos de células unitarias (°) | 90 90 120                |
|    | Reflexiones totales              | 308799                   |
| 15 | Reflexiones únicas               | 65702 (6404)             |
|    | Multiplicidad                    | 4.7 (4.8)                |
|    | Finalización (%)                 | 99.8 (100)               |
| 20 | Promedio I/sigma(I)              | 14.2 (2.3)               |

25

30

5

10

15

20

25

|                                       |               |
|---------------------------------------|---------------|
| Factor B de Wilson ( $\text{\AA}^2$ ) | 37.02         |
| R-sim.                                | 0.086 (0.681) |
| <b>Refinamiento</b>                   |               |
| Ref. para R-libre                     | 1996          |
| R-trabajo                             | 0.190         |
| R-libre                               | 0.233         |
| Cantidad de átomos que no son H       | 7057          |
| Macromoléculas                        | 6608          |
| Etilenglicol                          | 8             |
| agua                                  | 441           |
| Residuos de proteína                  | 850           |
| RMS (enlaces)                         | 0.010         |
| RMS (ángulos)                         | 1.1           |
| Rama preferida (%)                    | 97            |
| Prom. Factor B ( $\text{\AA}^2$ )     | 45.7          |
| Macromoléculas                        | 45.6          |
| Etilenglicol                          | 59.7          |
| Solvente                              | 47.1          |

(ii) Mapeo de epítomos de anticuerpos contra triptasa analizados mediante intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX) y medidos con MS

30

Se midieron las tasas de absorción de deuterio de la triptasa monomérica en presencia y

ausencia del anticuerpo para determinar las regiones estructurales que se modifican tras la unión al anticuerpo. Las muestras unidas contenían una mezcla 1:1 de tripsina y el anticuerpo respectivo, se prepararon e incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La concentración de tripsina anterior al marcado con deuterio fue de 30  $\mu$ M en las muestras unidas al anticuerpo y sin unir. Los experimentos de HDX implicaron la dilución de muestras 15 veces en amortiguador de marcado de deuterio que contenía acetato de histidina 20 mM a pH 7.0. Se tomaron por triplicado seis tiempos de marcado, con muestras logarítmicas de 30 segundos a 1000 minutos, se inactivaron al disminuir el pH a 2.5 y agregar 2 M de cloruro de guanidinio (GdmCl) y *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 0.25 M, y se inyectaron en un sistema 10 frío en línea, tal como se describió anteriormente (Mayne et ál., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 22:1898-1905, 2011).

En resumen, las muestras se hicieron pasar primero a través de una columna de pepsina inmovilizada (2.1 x 30 mm, Applied Biosystems) y se cargaron en una columna de trampa 15 (Acquity Vanguard C<sub>8</sub>) para desalación. Luego se separaron los fragmentos de péptidos mediante el uso de cromatografía de fase inversa con una columna BEH C<sub>18</sub> Acquity UPLC™ (tamaño de partícula de 1.7  $\mu$ m, 1.0 x 50 mm) y se introdujeron en el espectrómetro de masas (Thermo Orbitrap Elite™, 120k Hz resolución a m/z 400) para análisis de masa. Se prepararon las fases móviles cromatográficas tal como se describió anteriormente para minimizar el 20 intercambio inverso de deuterio (Walters et ál., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23: 2132-2139, 2012). Se utilizó el programa ExMS (Kan et ál. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 22:1906-1915, 2011) para identificar péptidos deuterados y preparar cromatogramas de iones extraídos, que luego se analizaron mediante guiones de python internos (Walters et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110:18898-18903, 2013). Estos guiones combinan los estados cargados redundantes, 25 ajustan las distribuciones isotópicas con binomios y extraen la cantidad de deuterio transportado, en promedio, por cada péptido.

### (iii) Masa intacta mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS)

30 Las proteínas purificadas (que incluyen tripsina y mutantes de esta) se acidificaron con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1 % (Thermo, Rockford, IL) y se diluyeron hasta una concentración

final de 10  $\mu$ M. Las muestras se analizaron en un tiempo de vuelo de cuadrupolo (Q-TOF) Agilent 6520 Accurate-Mass acoplado con una interfaz de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)-Chip Cube Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, CA). Se separaron las proteínas mediante HPLC de fase inversa en una columna PLRP-S de 150 mm x 75  $\mu$ m a una  
5 velocidad de flujo de 40 nL/min con un gradiente de 5-80 %, 10 min, del solvente acuoso A (H<sub>2</sub>O al 97 %, acetonitrilo al 3 %, ácido fórmico al 0.1 %) con respecto al solvente orgánico B (acetonitrilo al 98 %, ácido fórmico al 0.1 %). Los datos se recabaron con una estación de trabajo MassHunter® (Agilent, Santa Clara, CA) y se desconvolucionaron espectros de masa en bruto para generar datos de masa intactos. Se observaron los picos principales a 61764.4  
10 Da y 63152.9 Da. También se observó la adición de múltiples masas de GlcNAc (203 Da).

#### (iv) Resultados

La estructura cristalina de la triptasa humana muestra que cada monómero del tetrámero  
15 entra en contacto con sus vecinos en dos interfaces distintas a través de seis segmentos de bucle: la interfaz grande (entre los protómeros A/D y B/C) o la interfaz pequeña (entre los protómeros A/B y C/D) de acuerdo con la nomenclatura de protómeros descrita por Pereira et ál. *Nature* 392:306-11, 1998, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. Los seis bucles superficiales de cada protómero rodean al sitio activo y entran en  
20 contacto entre monómeros (Pereira, *supra*). Entre estos, el bucle 147, el bucle 70-80 y el bucle 37 entablan una interacción con la interfaz pequeña, y la solapa 173, el bucle 97 y el bucle 60 son importantes en la interacción de interfaces grandes. Si bien la interfaz pequeña implica solamente interacciones hidrofóbicas, la interfaz grande comprende varias interacciones polares cargadas además de interacciones hidrofóbicas. La heparina estabiliza  
25 adicionalmente las interfaces pequeñas, que se considera que son puntos de corte del tetrámero, al unir los residuos con cargas no covalentes con residuos con carga positiva que abarcan los dos protómeros adyacentes A/B y C/D. Ver Pereira *supra*. Naturalmente, las interfaces pequeñas son los puntos de corte del tetrámero, seguidas por la disociación del dímero por parte de las interfaces grandes. La semivida de la triptasa es de alrededor de 2-3  
30 horas en circulación en sangre humana luego del desarrollo de anafilaxis sistémica (ver, por ejemplo, Schwartz et ál. *J. Clin. Invest.* 83:1551-1555.1989). La semivida normal del tetrámero

es de alrededor de 30 minutos.

Se determinó si las interfaces de proteínas grandes o pequeñas que mantienen unidos a los tetrámeros de triptasa se desestabilizan tras la unión de hu31A.v11 o huE104.v2 a la triptasa.

- 5 Se generaron dos mutantes de triptasa que produjeron un enlace covalente de dos protómeros cercanos en el tetrámero a través de un enlace disulfuro entre moléculas ya sea en la interfaz grande (entre los protómeros A/D y B/C) o en la interfaz pequeña (entre los protómeros A/B y C/D) de acuerdo con la nomenclatura de protómeros descrita por Pereira et ál. *supra*. Por lo tanto, cuando se previene la disociación de la interfaz pequeña debido a la  
10 formación de dímeros unidos a disulfuro covalente, aún se permite la disociación de la interfaz grande. Por el contrario, cuando se previene la disociación de la interfaz grande debido a la formación de dímeros unidos a disulfuro covalente, aún se permite la disociación de la interfaz pequeña.
- 15 Tyr75 en la interfaz pequeña e Ile99 en la interfaz grande (numeración de quimotripsinógeno, Figura 7) se mutaron individualmente en cisteína. Estos sitios se seleccionaron debido a que se orientan en estas interfaces debido a la simetría casi doble del tetrámero (Sommerhoff et ál. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10984-91, 1999). El reemplazo de Tyr75 o Ile99 en cisteína *in silico* mediante el uso de software PyMOL mostró distancias respectivas de 2.4 Å y 3.2 Å  
20 entre los tioles de cada cisteína opuesta, que son un poco mayores que una longitud típica de un enlace disulfuro de 2.05 Å. No obstante, los dos mutantes de tetrámeros resultantes se expresaron y purificaron y contenían un enlace disulfuro que se había formado entre las interfaces respectivas según se determinó mediante análisis MS de péptidos trípticos. Además, ambos mutantes también eran enzimáticamente activos, pero con aproximadamente  
25 la mitad de la eficacia catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) en comparación con la triptasa tetramérica de tipo salvaje (Tabla 8).

**Tabla 8: Actividad enzimática de triptasa mutante y de tipo salvaje**

| Triptasa                              | $K_M$<br>( $\mu M$ ) | $V_{m\acute{a}x}$<br>(nM/seg) | $k_{cat}$<br>(1/s) | $k_{cat}/K_M$<br>(1/(M*s)) | Eficacia catalítica<br>(mutante/WT) |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| WT                                    | 554                  | 400                           | 100                | 180505.42                  | 1                                   |
| Y75C<br>Interfaz pequeña<br>bloqueada | 320                  | 133                           | 33.25              | 103906.25                  | 0.57                                |
| I99C<br>Interfaz grande<br>bloqueada  | 798                  | 235                           | 58.75              | 73621.55                   | 0.41                                |

Se analizó el tamaño de estos mutantes en complejo con hu31A.v11 Fab o huE104.v1 Fab. Cada uno de los mutantes de triptasa Y75C e I99C se mezcló con un exceso molar doble de Fab hu31A.v11 para la formación de complejos, tal como se describió anteriormente para la triptasa de tipo salvaje, y se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Como referencia para comparación, la triptasa tetramérica de tipo salvaje formó complejos con un Fab del anticuerpo huE104.v1, que se une específicamente a la triptasa, pero no disocia el tetrámero, y que pierde actividad de inhibición a una relación elevada de anticuerpo con respecto a tetrámero. La triptasa tetramérica de tipo salvaje en complejo con huE104.v1 Fab tuvo un tiempo de retención de 21.6 min (Figura 6A, pico de referencia). El análisis de SEC-MALS de este complejo determinó un peso molecular de 276.1 kDa, lo que indica un complejo que comprende un tetrámero de triptasa con cuatro Fabs unidos.

Fab hu31A.v11 formó complejos con los mutantes de triptasa tetramérica Y75C e I99C con tiempos de retención de 25.6 min (Figura 6A, ejecución 2, pico 1) y 23.9 min (Figura 6A, ejecución 3, pico 2), respectivamente (Figura 6A). Ambos tiempos de retención son mayores que los del complejo de referencia, lo que indica que ambos mutantes tetraméricos se disocian en sus dímeros respectivos enlazados de forma covalente tras la formación de complejos con Fab hu31A.v11. Se recolectaron muestras de cada pico y se analizaron mediante SDS-PAGE para confirmar las especies en cada pico (Figura 6B). El análisis SDS-PAGE de estos picos proteínicos eluidos muestran que tanto Fab hu31A.v11 como los dímeros de triptasa respectivos estaban presentes en la misma fracción (Figura 6B). El pico 3 (Tr de 28.1 min) y pico 4 (Tr de 31.6 min) de la ejecución 4 representaron el monómero WT en complejo con Fab hu31A.v11 y exceso de Fab, respectivamente. Una cantidad pequeña de la muestra del pico 3 se trasladó a la muestra del pico 4 en SDS PAGE. Ambos mutantes de triptasa en complejo con Fab hu31A.v11 se evaluaron con tiempos de retención mayores que los del pico de referencia, lo que indica que tanto la interfaz grande como la pequeña se desestabilizan tras la unión a Fab hu31A.v11. Esta desestabilización produce la disociación de tetrámeros, según se observa para el tetrámero de triptasa de tipo salvaje, que finalmente inactiva la actividad proteolítica de la triptasa. B12 Fab también desestabilizó ambos tetrámeros mutantes (no se muestran los datos).

Se estudió la unión del anticuerpo contra triptasa humanizado hu31A.v11 a la triptasa humana beta 1 madura mediante el uso de cristalografía de rayos X para determinar la estructura del complejo molecular entre triptasa y el fragmento Fab de hu31A.v11 a una resolución de 2.15 Å. El resultado fue una unidad asimétrica cristalográfica que contenía un complejo de triptasa /STI (inhibidor de tripsina de soja) que interactuaba con un hu31A.v11 Fab. Se incluyó el STI a fines de la cristalización.

Una definición de epítipo es el conjunto de aminoácidos de triptasa que se encuentran a menos de 4 Å de cualquier átomo del hu31A.v11 Fab. Se utilizó el programa PyMOL para hallar epítopos. Los residuos de aminoácidos en las cadenas de polipéptidos de triptasa pueden numerarse de acuerdo con una convención (numeración de quimotripsinógeno) que se desvía de la numeración secuencial para permitir comparaciones entre proteínas

homólogas. Se proporciona una tabla que traduce entre este esquema de numeración de residuos de triptasa y el esquema secuencial sencillo (Figura 7). Los residuos de triptasa que figuran a continuación se denominan de acuerdo con la convención, con el esquema de numeración secuencial del gen en paréntesis.

5

El epítipo de hu31A.v11 en la triptasa incluye los siguientes residuos: H36, Q50, V60c, K60d, D60e, L61, A62, A63, R65, P84, V85, S86, R87, E109, E110, P111 (numeración de quimotripsinógeno, correspondiente a H51, Q67, V80, K81, D82, L83, A84, A85, R87, P103, V104, S105, R106, E128, E129 y P130, respectivamente, de la SEQ ID NO: 71). Ver la Figura

10

8. Los residuos de los bucles de 60s, 80s y 100s de triptasa se encuentran en contacto cercano con Fab hu31A.v11, mientras que los residuos His36 y Gln50 se encuentran más en la periferia de la interacción con el Fab. Ver también Pereira et ál. *supra*. El contacto de Fab-triptasa excluye 760 Å<sup>2</sup> del solvente (cada lado), con contribuciones iguales de la cadena ligera (Val30, Thr31, Tyr32, Tyr34, Arg50, Tyr90, His92, Ser93, Tyr94) y la cadena pesada de Fab (Phe50, Ser52, Gly53, Ser54, Ser55, Thr56, Tyr58, Arg95, Tyr97, Asp98). Se considera que los residuos de epítopos descritos anteriormente también se aplicarían a otros anticuerpos derivados de 31A.

15

20

Cuando el dímero de Fab/triptasa del complejo ternario se superpuso a los protómeros de triptasa A y D del tetrámero de tipo salvaje (Pereira et ál. *supra*), se halló que los dos Fabs se encuentran del mismo lado del tetrámero, caso perpendicular al plano del tetrámero (Figura 9). La repetición de este proceso para los protómeros B y C coloca dos Fabs del lado opuesto del tetrámero. En particular, estos resultados resaltan discrepancias estéricas entre las cadenas ligeras de Fab, congruentes con el hecho de que el Fab se eluye como complejo 1:1 con triptasa monomérica en SEC y no como complejo con triptasa tetramérica (Figura 9).

25

30

La triptasa tetramérica no se mantiene unida de forma covalente y puede disociarse en monómeros en condiciones fisiológicas, según se monitorea mediante el deterioro de la actividad enzimática en el tiempo y cambios en el espectro de dicroísmo circular (CD) en solución (Schwartz et ál. *J. Biol. Chem.* 261:7372-7379, 1986; Schwartz et ál. *J. Immunol.* 144:2304-11, 1990). La unión de hu31A.v11 (Fab o IgG) a cada protómero del tetrámero

promovería y aceleraría la disociación del tetrámero, y evitaría cualquier reasociación de un tetrámero debido a los choques estéricos de los Fabs al unirse a la triptasa. Por lo tanto, la triptasa se disocia y se torna un monómero enzimáticamente inactivo de forma más rápida debido a cambios alostéricos en cada protómero provocados por la unión a hu31A.v11.

- 5 Debido a la pseudo simetría doble en el tetrámero, casi todas las interacciones que constituyen las interfaces grandes y pequeñas existen dos veces. Esto significa también que cada cambio sutil en la estructura de la triptasa provocado por la unión a hu31A.v11 se produce dos veces en cada interfaz, lo que potencia la desestabilización.
- 10 La estructura compleja de Fab hu31A.v11 con triptasa muestra cambios significativos en el bucle de 60s, que se encuentra en la interfaz grande. En particular, al unirse al hu31A.v11 Fab, el residuo Val60c (correspondiente a Val80 de la SEQ ID NO: 71) posee un cambio significativo en la cadena lateral en comparación con su posición de la estructura de triptasa no unida. En el tetrámero de triptasa no unido, Tyr173d del protómero cercano se encuentra
- 15 en una cavidad hidrofóbica creada por los residuos Val60c y Val90 (Figura 10, ambos con numeración de quimotripsinógeno, ver también la Figura 7). En el complejo de anticuerpo, el cambio conformacional de Val60c crea un impedimento estérico que evita que Tyr173d se una a dicha cavidad. Dado que la unión de hu31A.v11 a triptasa implica interacciones con partes del bucle de 60s y residuos cercanos, puede ser responsable por este cambio conformacional
- 20 en Val60c. Esto podría llevar a la desestabilización de una interfaz grande y, por lo tanto, potenciaría la disociación del tetrámero de triptasa en monómeros inactivos.

- El anillo de imidazol de His36 (numeración de quimotripsinógeno; correspondiente a His51 de la SEQ ID NO: 71) en la triptasa interactúa de forma hidrofóbica con Fab hu31A.v11, lo que
- 25 produce cambios de la traza de C $\alpha$  en el bucle de 30s de los residuos de triptasa His36, Pro37a y Tyr37b en comparación con los protómeros de triptasa en la estructura de tetrámero unido. Esto afecta la conformación de la cadena lateral de Tyr37b, de forma tal que pueda debilitarse una interacción hidrofóbica clave con un protómero cercano que comprende Pro152 y Pro152a en la interfaz pequeña (Figura 11, todos con numeración de
  - 30 quimotripsinógeno, ver también la Figura 7).

Los estudios de formación de complejos de las dos variantes de triptasa distintas bloqueadas con disulfuro Y75C e I99C con hu31A.v11 Fab muestran que el anticuerpo desestabiliza la interfaz grande y la pequeña de la triptasa tetramérica. Tanto los choques estéricos de los Fabs unidos al tetrámero como los cambios conformacionales en los residuos de interacción clave de la interfaz grande y pequeña son probablemente importantes en cuanto a su contribución a la disociación de los tetrámeros. Estos dos factores no son mutuamente excluyentes. El impedimento estérico que surge de los hu31A.v11 Fabs cuando se unen a cada protómero del tetrámero demostrado *in silico* indica que dos Fabs de una única IgG típicamente nunca se unirían de forma simultánea a un tetrámero (Figura 9). Esta observación coincide con el hallazgo de que tanto el Fab como la IgG de hu31A.v11 son capaces de disociar el tetrámero, mediante lo cual se inhibe la actividad enzimática. Esta observación indica también que no es probable que los monómeros asociados unidos por el anticuerpo se vuelvan a ensamblar para formar un tetrámero.

Luego, se llevaron a cabo experimentos de HDX de la triptasa monomérica unida a hu31A.v11 Fab para estudiar las interacciones de unión en solución. El grado de HDX en el tiempo se monitoreó mediante espectrometría de masa. Si bien este método proporciona información que indica el epítipo de unión de hu31A.v11, también detecta cambios alostéricos en la estabilidad conformacional que podrían producirse alejados del epítipo de unión al anticuerpo. Los enlaces de amida que mostraron un intercambio más lento de triptasa cuando hu31A.v11 estaba unido se ubicaron en las regiones de los residuos 25-29, 40-41, 57-59, 60-61, 66-67, 83-88, 108-110 y 231-233 (numeración de quimotripsinógeno). Al comparar estas regiones con los residuos de triptasa a menos de 4 Å del Fab hu31A.v11 como se observa en la estructura cristalina, se observó un grado elevado de superposición entre ambos métodos que identificó residuos del epítipo de unión en los bucles de 60s, 80s y 100s (Figura 8). Otras áreas identificadas mediante HDX, tales como las posiciones de las regiones de 20s, 40s, 50s y 230s de la secuencia de triptasa primaria, no se encuentran en contacto directo con el anticuerpo de acuerdo con la estructura cristalina, pero muestran una reducción de la dinámica conformacional en presencia de hu31A.v11. De manera interesante, los residuos 57-59 parecen verse afectados de forma alostérica por la unión a hu31A.v11. La hélice  $\alpha$  corta contiene el residuo His57 (numeración de quimotripsinógeno) que es parte de la triada

catalítica en proteasas de serina y es esencial para la actividad catalítica. Si bien los residuos 40 y 41 identificados mediante HDX no se encuentran en contacto directo con hu31A.v11, se encuentran en una ubicación estructural interesante como parte de una lámina beta antiparalela que presenta Tyr37b (numeración de quimotripsina) en su bucle de horquilla, que es un residuo de contacto importante para la interfaz pequeña, como se mencionó anteriormente (Figura 11). Las alteraciones estructurales de esta área podrían afectar la estabilidad de la interfaz pequeña y llevar posiblemente a la disociación de tetrámeros.

Los enlaces peptídicos en el bucle de 20s (todos residuos en el bucle no estructurado) y región de 230s (también denominada hélice de 230s), que también se someten a cambios de su dinámica estructural de acuerdo con HDX, están alejados del sitio de unión de hu31A.v11. Los experimentos de HDX monitorean cambios de la dinámica estructural y no distinguen entre cambios en la conformación del volumen y cambios en la estabilidad energética de una conformación particular. En general, se halló un grado elevado de congruencia entre la información estructural obtenida mediante HDX y cristalografía de rayos X y se identificaron residuos adicionales que se ven afectados de forma alostérica por la unión a hu31A.v11.

## *B. Análisis estructural de anticuerpos contra triptasa derivados de E104*

### *(i) Materiales y métodos*

Se utilizó huE104.v1 Fab para generar la estructura cristalina con el tetrámero de triptasa porque la unión de huE104.v1 no disocia el tetrámero. Se cultivaron cristales de triptasa/huE104.v1 a 19 °C mediante el uso del método de difusión de vapor al mezclar proteínas en 1:1 (v/v) con una solución de depósito que contenía Tris 0.1 M (pH 8.5), cloruro de calcio 0.2 M, polietilenglicol (PEG) 4000 al 20 % y etoxilato de pentaeritritol al 8 %. Los cristales se crioprotegieron en licor madre artificial que contenía Tris 0.1 M (pH 8.5), cloruro de calcio 0.2 M, PEG 3350 al 35 % y se congelaron de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido. Se recabaron datos de difracción a rayos SSRL 12-2 en una red cristalina monoclinica que se extendió a una resolución de 3Å mediante el uso de un detector de matriz Pilatus 6M y rayos X con longitud de onda de 0.9795 Å. Se redujeron los datos (Kabsch, *Acta Crystallogr. D Biol.*

*Crystallogr.* 66:125-132, 2010; Vonnrhein et ál. *Acta. Crystallogr.* D67:293-302, 2011) y se escalaron (Winn et ál. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67:235-242, 2011) y la estructura se resolvió mediante reemplazo molecular (McCoy et ál. *J. Appl. Crystallogr.* 40:658-674, 2007) en el grupo espacial P21 que reveló un tetrámero de triptasa unido mediante cuatro Fabs. Las sondas de búsqueda de reemplazo molecular fueron un protómero de triptasa de acceso de PDB 4A6L y un fragmento de anticuerpo Fab derivado del acceso de PDB 1FVD al analizar versiones modificadas con un intervalo de ángulos articulares mediante el uso de la función de rotación únicamente. Luego de un ajuste limitado, se reemplazó una región constante de Fab en una búsqueda de reemplazo molecular solamente mediante el uso de la región constante de 1FVD. La numeración del residuo de triptasa se cambió a un esquema de quimotripsinógeno y numeración del residuo Fab-E104v1 al esquema de Kabat. Se llevaron a cabo ajustes e inspección del mapa de densidad de electrones mediante el uso de Coot (Emsley et ál. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66:486-501, 2010) y la estructura se perfeccionó mediante el uso de REFMAC5 (Murshudov et ál. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67: 355-367, 2011) y Phenix.refine (Adams et ál. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 213-221, 2010). La recolección de datos y parámetros de medición de ajuste aparecen en la Tabla 9. Los experimentos de HDX se llevaron a cabo tal como se describió anteriormente.

**Tabla 9: Tabla de parámetros de medición de rayos X de triptasa beta-huE104.V1 Fab**

|                                                           |                          |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Datos</b>                                              |                          |
| Fuente de rayos X                                         | SSRL 12-2                |
| Longitud de onda (Å)                                      | 0.9795                   |
| Int. de resolución (Å)                                    | 50 – 3.0 (3.112 – 3.005) |
| Grupo espacial                                            | P21                      |
| <b>a, b, c</b> de la célula (Å)                           | 89.573 168.811 114.652   |
| <b><math>\alpha, \beta, \gamma</math> de la célula(°)</b> | 90 109.97 90             |
| <b>Reflexiones totales</b>                                | 214206                   |
| <b>Reflexiones únicas</b>                                 | 62353                    |
| <b>Multiplicidad</b>                                      | 3.4 (3.5)                |
| <b>Finalización (%)</b>                                   | 97.8 (99.7)              |
| <b>Promedio <math>I/\sigma(I)</math></b>                  | 11.3 (2.1)               |
| <b>B de Wilson (Å<sup>2</sup>)</b>                        | 72,2                     |
| <b>R-sim</b>                                              | 0.098 (0.577)            |
| <b>Refinamiento</b>                                       |                          |
| <b>Ref. para R-libre</b>                                  | 1266                     |
| <b>R-trabajo</b>                                          | 0.187 (0.278)            |
| <b>R-libre</b>                                            | 0.232 (0.340)            |

|    |                                        |       |
|----|----------------------------------------|-------|
| 5  | <b>Cantidad de átomos que no son H</b> | 20794 |
|    | <b>Macromoléculas</b>                  | 20689 |
|    | <b>Ligandos</b>                        | 100   |
|    | <b>Iones</b>                           | 3     |
|    | <b>agua</b>                            | 2     |
| 10 | <b>Residuos de proteína</b>            | 2702  |
|    | RMS (enlaces) (Å)                      | 0.01  |
|    | RMS (ángulos) (°)                      | 1.2   |
|    | Favorecidos por Ramachandran (%)       | 94    |
| 15 | Prom. Factor B (Å <sup>2</sup> )       | 71.5  |
|    | Macromolécula                          | 71.6  |
|    | Ligandos                               | 48.4  |
|    | Iones, agua                            | 71.6  |

## 20 (ii) Resultados

Para determinar si la interfaz grande o pequeña de proteína que mantienen al tetrámero de triptasa unido se desestabilizan tras la unión a huE104.v2 Fab, el mutante de triptasa tetramérico Y75C o I99C (ver más arriba) se mezcló con un exceso molar doble de Fab huE104.v2 para la formación de complejos y se analizó mediante SEC (Figura 6C). El huE104.v2 Fab formó complejos con el mutante de triptasa tetramérica Y75C y el cromatograma muestra dos picos con tiempos de retención de  $t_r=21.6$  min (Figura 6C, ejecución 1, pico 1) y  $t_r=31$  min (pico 4) que comprende Fab en exceso. El huE104.v2 Fab formó complejos con el mutante de triptasa tetramérica I99C y el cromatograma muestra dos picos con tiempos de retención de  $t_r=23.8$  min (Figura 6C, ejecución 2, pico 2) y  $t_r=31$  min (ejecución 2, pico 5) que comprende Fab en exceso. El análisis SDS-PAGE mostró que tanto

huE104.v2 Fab como el mutante dimérico de triptasa estaban presentes en los picos 1 y 2 y se encontraba presente un exceso de Fab en los picos 4 y 5 (no se muestran los datos). Para la comparación, el huE104.v2 Fab en complejo con el tetrámero de triptasa WT tuvo un tiempo de retención de  $t_r = 26$  min (Figura 6C, ejecución 3, pico 3), que comprende monómero unido por Fab huE104.v, que es menor que el mutante de tetrámero de triptasa I99C en complejo con huE104.v2 ( $t_r = 23.8$  min, ejecución 2, pico 2). El mutante de triptasa Y75C (el tetrámero mutante bloqueado por la interfaz pequeña) en complejo con huE104.v2 Fab tuvo un tiempo de retención similar al del complejo intacto estable del tetrámero de triptasa WT unido a cuatro Fabs de huE104.v1 (ver Figura 6A, ejecución 1, pico de ref). Por otro lado, el mutante de triptasa I99C (el tetrámero mutante bloqueado por la interfaz grande) en complejo con huE104.v2 tuvo un tiempo de retención mayor, que indica un complejo más pequeño que el primer pico de la ejecución 1. Los resultados indican que huE104.v2 Fab solo fue capaz de disociar la interfaz pequeña, pero no la interfaz grande del tetrámero. Por lo tanto, al unirse al tetrámero de triptasa de tipo salvaje, la unión a huE104.v2 Fab disocia solamente la interfaz pequeña. En las condiciones experimentales, la interfaz pequeña disociada puede restaurarse rápidamente mediante la heparina presente a una concentración local elevada (por ejemplo, 0.1 mg/ml), lo que llevaría a un nuevo ensamblaje del tetrámero. Esta concentración de heparina es sustancialmente mayor que la concentración de heparina fisiológica, que se informó que es de alrededor de 1.5  $\mu\text{g/ml}$  de suero (ver, por ejemplo, Engelberg et ál., *Circulation* 23:578-581, 1961 y Davids et ál. *S. Afr. Med. J.* 100:307-307, 2010). A una concentración baja de heparina, huE104.v2 Fab es capaz de disociar por completo el tetrámero de triptasa WT y neutralizar la actividad de la triptasa, aunque de forma menos potente que huE104.v2 en el formato de IgG.

Para obtener un mayor entendimiento del epítipo de unión exacto de huE104.v2 en la triptasa, se intentó cristalizar el complejo de Fab huE104.v2/triptasa. Dado que no se pudo obtener ningún cristal adecuado, se utilizó para la cristalización el complejo de triptasa tetramérica WT unida a cuatro Fabs E104.v1 aislados mediante cromatografía de exclusión por tamaño. huE104.v1 y huE104.v2 difieren únicamente en dos posiciones de marco de vernier, mientras que las HVR son idénticas. Por lo tanto, huE104.v1 fue un buen sustituto para dilucidar el epítipo de unión de huE104.v2. Se estudió la unión del anticuerpo contra

triptasa humanizado huE104.v1 (ver Ejemplo 1) a la triptasa humana beta 1 madura mediante el uso de cristalografía de rayos X para determinar la estructura del complejo molecular entre triptasa y el fragmento Fab de huE104.v1 a una resolución de 3.0 angstrom (Å). El resultado fue una unidad asimétrica cristalográfica que contenía un tetrámero de triptasa, estabilizada mediante la formación de un complejo con EGR-clorometilcetona en interacción con cuatro huE104.v1 Fabs de forma tal que cada Fab interactuara de forma casi exclusiva con solamente uno de los protómeros de triptasa (Figura 12A). El entorno de empaque cristalino intermolecular no incluye vacíos grandes, y posee una cantidad moderada de contactos de empaque cristalino de menos de 4Å. Por ejemplo, dos dominios VL de huE104.v1 Fab presentan un contacto doble no cristalográfico en la cara de su cadena β de ABDE, que implican enlaces H de las cadenas Thr y Ser y otros. Existe otra región más pequeña con varios contactos intermoleculares entre un dominio constante de cadena pesada (cerca del enlace peptídico al dominio variable de la misma cadena) y el “fondo” de un dominio constante de cadena ligera adyacente. Hay más residuos en los contactos de empaque de los Fabs (promedio de 12) que para los protómeros de triptasa (promedio de 3.5), a pesar de que los protómeros de triptasa tienen más residuos (243 en comparación con aproximadamente 215). En este sentido, los cristales se forman al menos parcialmente a través de contactos entre moléculas Fab-Fab.

Tres copias de huE104.v1 Fab presentaron ángulos articulares (los ángulos entre los dominios variables (VH y VL) y dominios constantes (CH y CL) muy similares de 140°, 138° y 141°. La cuarta copia de huE104.v1 Fab se caracterizó mediante una densidad electrónica relativamente deficiente para su región constante y presentó un ángulo articular de 152°. Las áreas superficiales de unión al antígeno del anticuerpo (parátomos), calculadas como pérdida de área superficial accesible para el solvente (Adams et ál. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66:213-221, 2010) con respecto al contacto con un protómero de triptasa, promedian 682 Å<sup>2</sup> y se ven dominadas por la cadena pesada, 71 %, contra 29 % para la cadena ligera. La estadística de complementariedad de forma (Lawrence et ál. *J. Mol. Biol.* 234:946-950, 1993), Sc, promedió 0.76, que se encuentra en el extremo elevado para anticuerpos con antígenos de proteína. La resolución de nuestro resultado fue demasiado baja para discernir la estructura del agua, pero los valores Sc sugieren que probablemente hay

muy pocas aguas de interfaz. El uso de simetría no cristalográfica (NCS) limita los ajustes superiores producidos de acuerdo con el valor de R-libre. Las desviaciones cuadráticas medias (RMSD) para la superposición de átomos C $\alpha$  de dominios Fab (VL, CL, VH o CH1) se encontraron en el orden de unos pocos décimos de un angstrom.

5

Los residuos de anticuerpo a menos de 4Å de su triptasa compañera fueron muy similares para las cuatro copias e incluyen: los residuos de cadena ligera Y29, N30, R32 (HVR-L1), R94 (HVR-L3) y los residuos de cadena pesada G31, Y32 (HVR-H1), S52, S53, A54, T56, F58 (HVR-H2) y P96, R97, G98, Y99, R100e (HVR-H3).

10

Cada huE104.v1 Fab entra en contacto con una región muy análoga de un protómero de triptasa compañera. Este epítipo se encuentra a aproximadamente 90° de la hendidura de unión al sustrato del sitio activo, y coloca a cada Fab que se proyecta perpendicular desde el plano del tetrámero de triptasa plano aproximadamente cuadrado. Dado que los protómeros de triptasa se asocian de forma arriba/abajo/arriba/abajo alrededor del anillo de triptasa, hay dos Fabs que se proyectan “hacia arriba” desde el tetrámero y dos Fabs que se proyectan “hacia abajo” (Figura 12A).

15

20

La unidad asimétrica cristalográfica (asu) incluye 4 protómeros de triptasa organizados en un tetrámero aproximadamente simétrico. Cada uno de los cuatro protómeros de triptasa se modifica de forma covalente en el sitio activo (del tratamiento con Glu-Gly-Arg-clorometil cetona) y se superponen con rmsd en pares en función de átomos C $\alpha$  de alrededor de 0.1Å. Si cada protómero se encontrara a menos de 4 Å de solo uno de los cuatro Fabs de la asu, sería posible definir cuatro epítipos de huE104.v1, uno para cada protómero de triptasa y, en ausencia de simetría, estos cuatro epítipos pueden diferir ligeramente. Hay unos pocos residuos de triptasa que se encuentran a menos de 4 Å de un Fab que no proporciona el volumen de interacciones con este, que se denomina en la presente “Fab no compañero”. Dado que esto es verdadero, también es posible definir el epítipo de huE104.v1 para el tetrámero de triptasa.

25

30

Se utilizó el programa PyMOL para identificar el epítipo, que en este Ejemplo es el conjunto

de aminoácidos de triptasa que se encuentran a menos de 4 Å de cualquier átomo del huE104.v1 Fab. Los residuos de aminoácidos en las cadenas de polipéptidos de la triptasa pueden numerarse de acuerdo con el esquema de numeración de quimotripsinógenos, como se describió anteriormente (Figura 7). Los residuos de triptasa que figuran a continuación se denominan de acuerdo con el esquema de numeración de quimotripsinógenos, con el

Se definen 4 epítomos entre un protómero de triptasa y su Fab compañero. Los cuatro contienen un conjunto prácticamente idéntico de residuos de aminoácidos de triptasa. Dichos residuos son: W38, Q50, D60e, L61, A62, R65, Q81, L82, L83, P84, V85, S86, R87, E107, L108, E109 y E110 (numeración de quimotripsinógeno, correspondiente a los residuos W55, Q67, D82, L83, A84, R87, Q100, L101, L102, P103, V104, S105, R106, E126, L127, E128 y E129, respectivamente, mediante el uso del esquema de numeración secuencial del gen, con residuos correspondientes a las posiciones de la SEQ ID NO: 71). El residuo L61 (L83 de la SEQ ID NO: 71) se encuentra ausente en dos de los cuatro, pero supera el criterio de 4 Å de forma mínima. El residuo Q81 (Q100 de la SEQ ID NO: 71) está ausente en uno de los cuatro. Si este no fuera el caso, los cuatro serían idénticos de acuerdo con el criterio de definición.

A su vez, los Fabs no compañeros componen una cantidad pequeña de contactos de 4 Å en el tetrámero. Son estos residuos de triptasa que distinguen un epítomo de tetrámero de un epítomo de protómero. Los residuos de triptasa en contacto son: Q20 y R187 (Q35 y R216, respectivamente, de la SEQ ID NO: 71).

Por lo tanto, el epítomo de huE104.v1 del tetrámero de triptasa es la suma de: 4 instancias de cada uno de los siguientes: W38, Q50, D60e, L61, A62, R65, L82, L83, P84, V85, S86, R87, E107, L108, E109 y E110 (numeración de quimotripsinógeno, correspondiente a los residuos W55, Q67, D82, L83, A84, R87, L101, L102, P103, V104, S105, R106, E126, L127, E128 y E129, respectivamente, de la SEQ ID NO: 71), más tres instancias de Q81 (Q100 de la SEQ ID NO: 71), más 1 instancia de Q20 (Q35 de la SEQ ID NO: 71), más tres instancias de R187 (R216 de la SEQ ID NO: 71). Se considera que los residuos de epítomos descritos anteriormente también se aplicarían a otros anticuerpos derivados de E104, incluso

huE104.v2.

Si bien huE104.v1 y v2 poseen las mismas secuencias de CDR, y se unirían al mismo epítipo, las dos variantes se comportan de forma distinta en el Fab y en la IgG: el huE104.v2

5 Fab disocia el tetrámero y más específicamente en la interfaz pequeña, mientras que el huE104.v1 Fab no lo hace; y en la IgG, el huE104.v2 disocia e inactiva el tetrámero, mientras que huE104.v1 pierde la actividad de inhibición a una relación elevada de anticuerpo con respecto a triptasa. Se conjetura que, si bien huE104.v1 y huE104.v2 se unen a los mismos

10 residuos de contacto en la triptasa, existen diferencias sutiles entre cómo interactúan con la triptasa. Con el fin de identificar diferencias en la interacción entre huE104.v1 y huE104.v2 Fabs con triptasa en solución, se llevaron a cabo experimentos de HDX con triptasa monomérica sol o unida ya sea a huE104.v1 o huE104.v2, y se monitoreó el grado de intercambio de hidrógeno-deuterio en el tiempo mediante espectrometría de masa. Si bien

15 este método proporciona información que indica los epítopos de unión de huE104.v1 y huE104.v2, monitorea en general los cambios de la dinámica estructural que podrían producirse alejados del epítipo de unión al anticuerpo. Estas mediciones no distinguen entre cambios en la conformación del volumen y cambios en la estabilidad energética de una conformación particular.

20 Los enlaces de amida que mostraron un intercambio más lento en triptasa cuando estaban unidos a huE104.v1 o huE104.v2 se encontraron en las regiones de los residuos 25-27, 60-61, 66-68, 88 y 108-110 (numeración de quimotripsinógeno; Tabla 10), pero también se hallaron enlaces de amida que mostraron un intercambio más lento que eran específicos para solamente huE104.v1 o huE104.v2. Por ejemplo, los enlaces de amida de los residuos de

25 triptasa 47-50, 54-55, 85-87, 119-122, 179, 230-231 y 244-245 (numeración de quimotripsinógeno) mostraron un intercambio más lento solamente cuando huE104.v1 estaba unido. Por otro lado, los enlaces de amida de los residuos de triptasa 25, 41-43, 81-81 y 160-162 mostraron un intercambio más lento solamente cuando huE104.v2 estaba unido (Tabla 10). Las diferencias más interesantes en el intercambio de hidrógeno más lento son los

30 enlaces de amida de los residuos 81-83 (Q81, L82 y L83 de la numeración de quimotripsinógenos, correspondientes a Q100, L101 y L102 de la SEQ ID NO: 71) de la

triptasa, que mostraron un intercambio más lento solamente cuando huE104.v2 estaba unido. Esta área es particularmente interesante, porque es parte del bucle en el que residen dos residuos de contacto fundamentales (Y74 e Y75) de la interfaz pequeña. Los residuos de triptasa 81-83 también se encuentran en contacto directo con la HVR-H2 de huE104.v1, tal como se observa en el complejo de estructura cristalina con la triptasa tetramérica, pero de acuerdo con los resultados de la HDX, se considera que esta área debe interactuar de forma más potente y supuestamente distinta con huE104.v2 que el huE104.v1 con triptasa. Los cambios conformacionales de la cadena principal C $\alpha$  y cadena lateral del bucle de 80s podrían afectar la conformación de Y74 e Y75, que son fundamentales para la interfaz pequeña hidrofóbica entre dos protómeros de triptasa en el complejo de tetrámeros. Dado que la interfaz es simétrica, los residuos Y74 e Y75 de ambos protómeros de interacción se ven afectados cuando huE104.v2 se une a cada protómero, lo que podría amplificar cualquier cambio e inestabilidad de su interfaz.

Como se mencionó anteriormente, las diferencias entre huE104.v1 y huE104.v2 son los residuos de marco de vernier V71R y F78V. Se ha informado anteriormente que los cambios de los residuos marco de la posición 71 de la cadena pesada de anticuerpos afecta la conformación de HVR-H2. Los experimentos de modelado de HVR-H2 en huE104.v1 y huE104.v2 confirman que este es el caso (no se muestran los datos). Sin limitarse a la teoría, los cambios en ambos residuos de vernier podrían afectar la conformación de HVR-H2 de forma tal que difiera la interacción con los residuos de triptasa 81 a 83 y se traduzca en cambios de la interfaz pequeña del tetrámero. Además, los enlaces de amida de triptasa de los residuos R69 y E70 (numeración de quimotripsinógenos), que se encuentran cerca de forma estructural, también muestran un HDX más lento solo cuando huE104.v2 está unido. Este hallazgo haría que los cambios en el bucle de 70s, que constituye una parte significativa de la interfaz pequeña, fueran incluso más probables.

Al comparar las regiones de HDX más lento debido a la unión de Fab con los residuos de triptasa a menos de 4 Å del Fab E104.v1 como se observa en la estructura cristalina, se observó un grado elevado de superposición entre ambos métodos que identificó residuos del epítipo de unión en los bucles de 20s, 40s, 60s, 80s y 100 (Tabla 10). Otras áreas

identificadas mediante HDX, tales como las posiciones de las regiones de 110s, 160s, 179, 230s y 245 de la secuencia de tripsina primaria, no se encuentran en contacto directo con el anticuerpo de acuerdo con la estructura cristalina, pero muestran una reducción de la dinámica conformacional en presencia de huE104.v1 y huE104.v2.

5

**Tabla 10: Enlaces amida de los residuos de tripsina que mostraron HDX menor al unirse a huE104.v1 o huE104.v2**

10

15

20

25

30

| Residuos de tripsina afectados (numeración de quimotripsinógeno) |           |                                                  |
|------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| huE104.v1                                                        | huE104.v2 | Residuos de contacto en la estructura cristalina |
| 26-27                                                            | 25-27     | 25-29                                            |
| -                                                                | -         | 38                                               |
| -                                                                | 41-43     | 40-41                                            |
| 47-50                                                            | -         | 50                                               |
| 54-55                                                            | -         | -                                                |
| -                                                                | -         | -                                                |
| 60-61                                                            | 60-61     | 60-62                                            |
| 66-68                                                            | 66-70     | 65                                               |
| -                                                                | 81-83     | 81-87                                            |
| 85-88                                                            | 88        | -                                                |
| 108-110                                                          | 108-110   | 107-110                                          |
| 119-122                                                          | -         | -                                                |

|         |         |   |
|---------|---------|---|
| -       | 160-162 | - |
| 179     | -       | - |
| 230-231 | -       | - |
| -       | -       | - |
| 244-245 | -       | - |

5

10

15

20

25

Para resumir estos datos, huE104.v1 y huE104.v2 tienen las mismas secuencias de HVR y los mismos residuos de contacto en la triptasa humana beta 1. No obstante, en función de los estudios de HDX, se detectaron diferencias sutiles en la forma en que los dos anticuerpos se unen al objetivo. Se muestran en la Figura 12B V71 y F78 en la región FR3 de cadena pesada de huE104.v1. Tal como se indica en la figura, el V71R y F78V en la región FR3 de la cadena pesada de huE104.v2 puede haber afectado la posición de HVR-H2 y la unión de HVR-H2 a la triptasa, como lo demuestra el HDX más lento en la región Q81, L82 y L83 (numeración de quimotripsinógenos) cuando huE104.v2 está unido. Los residuos Q81, L82 y L83 mostraron un HDX más lento cuando huE104.v2 estaba unido a la triptasa en comparación con la triptasa no unida. Como resultado, se debilita la interacción hidrofóbica de Y75 con el protómero cercano. El huE104.v1 posee V en la posición 71 y F en la posición 78 (como en el injerto de VH<sub>M</sub>). En este contexto, la HVR-H2 se presenta de forma ligeramente distinta, y el efecto de la unión de E104.v1 a la triptasa, aunque se encuentra en los mismos residuos de contacto, difiere levemente en la disociación de la interfaz pequeña, en comparación con E104.v2.

30

En resumen, hu31A.v11 Fab e IgG disocian ambos el tetrámero de triptasa. Tanto huE104.v2 Fab como IgG también disocian el tetrámero de triptasa. El huE104.v1 IgG, pero no Fab, es capaz de disociar el tetrámero de triptasa. No obstante, el huE104.v1 IgG en una relación elevada de anticuerpo con respecto a tetrámero pierde actividad de inhibición. La unión de más de un hu31A.v11 Fab al mismo tetrámero provocaría un choque estérico, mientras que la

unión de huE104.v2 Fabs al mismo tetrámero no lo haría. Por lo tanto, la región bisagra de IgG1 o IgG4 puede desempeñar un papel en la orientación de los dos Fabs del huE104.v1 IgG y crea una tensión suficiente que produce la disociación del tetrámero (no se muestran los datos). No obstante, con una relación elevada de anticuerpo con respecto a tetrámero, huE104.v1 IgG se une más probablemente al tetrámero como aglutinante monovalente, es decir, un Fab, y pierde la actividad de inhibición.

### *C. Competencia de hu31A.v11 y huE104.v2 por la unión a triptasa humana beta 1*

El epítipo de hu31A.v11 determinado mediante cristalografía de rayos X se superpone de forma sustancial con el epítipo de huE104.v1 y huE104.v2. Luego se determinó si hu31A.v11 y huE104.v2 competían por la unión a triptasa humana beta 1 mediante clasificación de epítipos. La clasificación de epítipos se realizó mediante el uso del sistema RED384 de OCTET® (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, EUA). En resumen, la proteína monomérica de triptasa humana  $\beta$  1 se biotiniló en el residuo Lys al reaccionar con NHS-PEG4-biotina. El monómero biotinilado se diluyó a 5  $\mu$ g/ml en amortiguador cinético (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA, EUA) y se inmoviliza en puntas de sensor de estreptavidina (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA). Luego de la etapa de inmovilización, los sensores inmovilizados con triptasa humana beta 1 se saturaron con el primer anticuerpo, se diluyen 10-20  $\mu$ g/ml, seguido por la unión con un segundo anticuerpo diluido a 2.5  $\mu$ g/ml. Una señal de unión del segundo anticuerpo implica que los dos anticuerpos pueden unirse al antígeno de manera simultánea en epítipos separados no superpuestos, mientras que una ausencia de señal de unión implica que comparten un epítipo en común. Se utilizó el software de análisis de datos 8.1 de Forte Bio para generar una matriz de clasificación de epítipos.

25

Los resultados que se muestran en la Tabla 11 que figura a continuación demuestra que tampoco se detectó una señal de unión adicional mediante el uso de huE104.v2 como el primer anticuerpo y hu31A.v11 como el segundo anticuerpo, o viceversa. Cualquier anticuerpo agregado luego del amortiguador produjo una unión adicional. Por lo tanto, los dos anticuerpos compiten por la unión a triptasa humana beta 1.

30

**Tabla 11: competencia de hu31A.v11 y huE104.v2 por la unión a triptasa humana beta 1**

| 1. <sup>er</sup> anticuerpo | 2. <sup>do</sup> anticuerpo |                |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
|                             | hu31A.v11 IgG4              | huE104.v2 IgG4 |
| huE104.v2 IgG4              | -0.0086                     | -0.0083        |
| Hu31A.v11 IgG4              | -0.0205                     | 0.011          |
| Amortiguador                | 0.423                       | 0.514          |

**Ejemplo 4: Análisis farmacocinético (PK) de anticuerpos contra triptasa humanizados**

Para evaluar las características farmacodinámicas (PK) de los anticuerpos contra triptasa humanizados, se administraron anticuerpos huE104.v2 o hu31A.v11 IgG4 mediante inyección intravenosa (IV) a 1 o 10 mg/kg a ratones C57BL/6, n = 3. La concentración de IgG4 contra gD, hu31A.v11 IgG4 contra triptasa o huE104.v2 IgG4 contra triptasa en suero de ratón C57-BL6 se determinó con un ELISA farmacocinético de inmunoglobulina genérico mediante el uso de IgG de oveja antihumana (The Binding Site; San Diego, CA) para captura e IgG de oveja conjugada con HRP antihumana (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) para detección. La sensibilidad del ensayo fue de 15.6 ng/mL en suero. Los anticuerpos huE104.v2 y hu31A.v11 IgG4 presentaron una PK similar, caracterizada por una PK lineal y proporcional a la dosis en todo el intervalo de dosis evaluado (Figura 13 y Tabla 12). Además, ambos anticuerpos tuvieron una depuración relativamente baja (~5 ml/día/kg), lo que sugiere que ambos anticuerpos se comportan de forma correcta luego de la administración de la dosis única y se encuentran dentro del intervalo aceptado. En otros experimentos, huE104.v2 IgG1 tuvo un rendimiento similar a los anticuerpos huE104.v2 IgG4 y hu31A.v11 IgG4 (no se muestran los datos).

**Tabla 12: Análisis PK de anticuerpos contra triptasa humanizados en ratones**

| <b>IgG4 contra<br/>triptasa</b> | <b>Dosis</b> | <b>AUC<sub>final</sub><br/>(día • µg/ml)</b> | <b>Depuración<br/>(ml/día/kg)</b> | <b>C<sub>máx</sub><br/>(µg/mL)</b> |
|---------------------------------|--------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| huE104.v2                       | 1 mg/kg      | 127                                          | 5.00                              | 21.6                               |
| huE104.v2                       | 10 mg/kg     | 1400                                         | 5.12                              | 242                                |
| hu31A.v11                       | 1 mg/kg      | 155                                          | 4.74                              | 25,8                               |
| hu31A.v11                       | 10 mg/kg     | 1750                                         | 4.54                              | 251                                |

También se evaluaron las características de PK de los anticuerpos contra triptasa humanizados en monos cynomolgus (cyno) machos, n=3. Se administró un anticuerpo de control (anti-gD), huE104.v2 IgG4 o hu31A.v11 IgG4 mediante inyección intravenosa (IV) a 30 mg/kg (Figura 14 y Tabla 13). La concentración de IgG4 contra gD, hu31A.v11 IgG4 contra triptasa o huE104.v2 IgG4 contra triptasa en suero de mono cynomolgus se determinó con un inmunoensayo Gyrolab XP que consistía en IgG antihumana de cabra conjugada a biotina IgG (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) para captura y Fc antihumano de ratón conjugado con Flúor 647 Alexa® (R10Z8E9) para detección. La sensibilidad del ensayo fue de 41 ng/mL en suero. La Tabla 13 muestra el área debajo de la curva (AUC), depuración (CL), C<sub>máx</sub> y semivida (T<sub>1/2</sub>). hu31A.v11 presentó una farmacocinética similar al anticuerpo contra gD de control. Una depuración (CL) baja de aproximadamente 3 mL/días/kg y T<sub>1/2</sub> de alrededor de 15 días se encontraron dentro del intervalo aceptable.

**Tabla 13: Análisis PK de anticuerpos contra triptasa humanizados en cyno (n=3)**

| <b>Grupo</b> | <b>AUC<br/>(día • µg/mL)</b> | <b>CL<br/>(mL/día/kg)</b> | <b>C<sub>máx</sub><br/>(µg/mL)</b> | <b>T<sub>1/2</sub><br/>(días)</b> |
|--------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| Anti-gD      | 11100 ± 1220                 | 2,73 ± 0.285              | 972 ± 68.8                         | 14.1 ± 1.37                       |
| hu31A.v11    | 10700 ± 3530                 | 2,99 ± 0.855              | 805 ± 72.3                         | 14.9 ± 5.95                       |
| huE104.v2    | 7910 ± 2270                  | 3,98 ± 1.00               | 808 ± 48.9                         | 11.5 ± 4.43                       |

**Ejemplo 5: Formulación del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 para mejorar la oxidación de HVR-H3 Trp100 (W100)**

Si bien la evaluación de los anticuerpos hu31A.v11 y huE104.v2, se descubrió de forma inesperada que el residuo Trp100 de VH presente en la región HVR-H3 de hu31A.v11 (Figura 1) es susceptible a oxidación, por ejemplo, luego de la exposición a diclorhidrato de 2,2-azobis(2-amidinopropano)(AAPH) (también denominado “estrés de AAPH”) o luz ambiental (“tensión de luz ambiental”). Esta oxidación puede considerarse indeseable en el contexto de un anticuerpo terapéutico. No obstante, se halló que el residuo Trp100 era importante para la unión de hu31A.v11 a la triptasa, así como para la actividad de inhibición. Por ejemplo, como se describe más adelante, la mutación de Trp100 para mitigar la oxidación produjo variantes con una menor afinidad de unión y actividad de inhibición. Por lo tanto, la oxidación de hu31A.v11, particularmente en W100 de HVR-H3, se mitigó mediante el uso de formulaciones que contenían un excipiente antioxidante, por ejemplo, N-acetiltriptófano y/o metionina.

Se evaluó el efecto de estrés de AAPH y la oxidación de W100 de HVR-H3 de hu31A.v11 (es decir, el residuo de triptófano en la posición 100 del dominio VH, ver Figura 1) sobre la actividad de inhibición y la unión a triptasa. Se formularon muestras en AAPH 1 mM durante 16 horas a 40 °C. En estas condiciones, hubo un aumento de 75 % de la oxidación de W100 (oxidación porcentual). El anticuerpo estimulado se digirió con tripsina y los péptidos digeridos se sometieron a UHPLC-HRMS (cromatografía líquida de alto rendimiento-espectrometría de masa de alta resolución) para determinar el porcentaje de oxidación de triptófano. En resumen, una muestra de 250 µg de hu31A.v11 se redujo con DTT 20 mM en clorhidrato de guanidina 6 M, Tris 360 mM y EDTA 2 mM a pH 8.6 durante 1 hora. La muestra reducida se enfrió a temperatura ambiente y se alquiló mediante el uso de ácido yodoacético 1 M (concentración final, 50 mM) durante 15 minutos en la oscuridad. Luego se intercambió el amortiguador de la muestra por amortiguador de digestión (Tris 25 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8.2). La muestra con intercambio de amortiguador se digirió con tripsina durante 4 horas a 37 °C

mediante el uso de una relación de 1:40 (p/p) de enzima con respecto a anticuerpo. La digestión se detuvo mediante la adición de ácido fórmico al 100 % hasta una concentración final de 3.0 %.

- 5 Se inyectaron 10 µg de péptidos trípticos en una columna C18 Waters 2.1 x 150 mm, Acquity UPLC® CSH con partículas de 1.7 µm, 130 Å, a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min a 77 °C acoplada a un sistema de espectrómetro de masas Q Exactive con el siguiente gradiente: 1 % de B (0.1 % de ácido fórmico en acetonitrilo) a 0-2 min; 13 % de B a 7 min; 35 % B a 42 min; 85 % de B 44-46 min; 1 % de B a 46.1 min. El Q Exactive funcionó en modo dependiente de
- 10 datos, recabó un barrido de MS completo de 200–2000 *m/z* a una resolución de 35.000 y un objetivo de control de ganancia automático (AGC) de  $1 \times 10^6$ . Se seleccionaron los 8 iones más abundantes por barrido para MS en tándem a una resolución de 17.500 y objetivo de AGC de  $1 \times 10^5$ . La cuantificación relativa de oxidación de W100 se generó de la siguiente forma: (1) Se calcularon las áreas pico al integrar cromatogramas de iones extraídos de los tres isótopos
- 15 más abundantes de los estados de carga con una abundancia relativa de 10 % y mayor para el péptido tríptico natural y sus equivalentes oxidados. (2) El área pico oxidada total se dividió entre la suma de las áreas pico naturales y oxidadas y se multiplicó por 100 para obtener la oxidación porcentual.
- 20 Los resultados de la Tabla 14 muestran que el estrés de AAPH redujo la unión de hu31A.v11 al monómero de triptasa medido a través de análisis de SPR BIAcore® (Tabla 14). También se observó una reducción de la unión al tetrámero de triptasa. Por el contrario, la unión de huE104.v2 al monómero y tetrámero de triptasa no se vio afectada por el estrés de AAPH (Tabla 14). Además, el estrés de AAPH redujo la actividad de hu31A.v11 en un ensayo de
- 25 actividad enzimática de triptasa in vitro alrededor de 5 veces, mientras que la actividad de inhibición de huE104.v2 no se vio afectada (no se muestran los datos). En resumen, luego del estrés de AAPH, hu31A.v11 IgG4, que tenía una oxidación de 75 % en W100 de HVR-H3, mostró una  $K_D$  aproximadamente 6 veces mayor (es decir, afinidad reducida) (con 35 % de  $R_{m\acute{a}x}$ ) y una  $IC_{50}$  5 veces mayor (es decir, disminución de potencia). La  $R_{m\acute{a}x}$  indica la
- 30 respuesta máxima en un experimento de SPR BIAcore® y una disminución de  $R_{m\acute{a}x}$  refleja el hecho de que se une a la triptasa una cantidad menor del anticuerpo estresado con AAPH.

Por el contrario, el estrés de AAPH tuvo un efecto mínimo, si existió en absoluto, sobre la unión y potencia de huE104.v2 IgG4.

**Tabla 14: Reducción de la unión de hu31A.v11 a triptasa con estrés de AAPH**

| Muestra           | Triptasa beta 1 | $K_{on}$<br>(1/Ms) | $K_{off}$<br>(1/s) | $K_D$<br>(M) |
|-------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------|
| hu31A.v11 Control | Monómero        | 5.976E5            | 1.328E-4           | 2.222E-10    |
| hu31A.v11 AAPH    | Monómero        | 6.076E5            | 7.978E-4           | 1.313E-9     |
| huE104.v2 Control | Monómero        | 5.846E5            | 1.861E-4           | 3.183E-10    |
| huE104.v2 AAPH    | Monómero        | 6.795E5            | 1.535E-4           | 2.260E-10    |

En un abordaje para reducir la oxidación de HVR-H3, se produjeron anticuerpos variantes con sustituciones en W100 de HVR-H3, y se evaluó la unión de estas variantes a monómeros de triptasa beta 1 (Tabla 15). El residuo W100 de hu31A.v11 se mutó a fenilalanina (F), tirosina (Y), valina (V), leucina (L) o arginina (R). De manera sorprendente, todas las variantes mostraron una reducción de la unión al monómero de triptasa beta 1. La variante W100F de hu31A.v11 tuvo la mayor afinidad para el monómero de triptasa beta 1 en comparación con las otras variantes, pero presentó una velocidad de disociación ( $K_{off}$ ) aproximadamente 100 veces mayor en comparación con hu31A.v11 de tipo salvaje, con una velocidad de asociación ( $K_{on}$ ) similar (Tabla 15). Además, estas variantes fueron inferiores a hu31A.v11 WT en términos de actividad de inhibición (Tabla 15). Para algunas de las variantes, se perdió esencialmente la actividad de inhibición (por ejemplo, para W100R, W100L y W100V). Las variantes W100F y W100Y de hu31A.v11 inhibieron la triptasa humana beta 1, pero tuvieron valores de IC<sub>50</sub> aproximadamente 2 a 3 veces mayores (es decir, actividad reducida) en comparación con hu31A.v11 WT. En la Tabla 15, “nd” indica no detectable o por encima de 1  $\mu$ M.

**Tabla 15: Efecto de las variantes de W100 de hu31A.v11 sobre la afinidad de unión al**

**monómero de triptasa beta 1 e IC50 en comparación con hu31A.v11 de tipo salvaje  
(como aumento múltiplo)**

5

|                      | hu31A.v11<br>(W100) | hu31A.v11<br>W100F | hu31A.v11<br>W100Y | hu31A.v11<br>W100V | huE104.v2<br>W100L | huE104.v2<br>W100R |
|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <b>K<sub>D</sub></b> | 1                   | 80                 | 234                | 821                | 2411               | 54                 |
| <b>IC50</b>          | 1                   | 2.5                | 3.46               | nd                 | nd                 | nd                 |

10

Como se describió anteriormente, los estudios estructurales revelaron que W100 de HVR-H3 realizó múltiples interacciones con la triptasa, incluso interacción con R65 de triptasa (numeración de quimotripsinógenos), que se determinó que es parte de los residuos de contacto de hu31A.v11 (ver Figura 8). Se considera que Trp en la posición 100 interactúa con la triptasa en mayor medida que Phe en el mutante W100F, lo que produce una mayor afinidad de unión y una actividad de inhibición más potente.

15

20

25

30

A la vista de la menor afinidad y actividad de inhibición de hu31A.v11 con oxidación en W100 de HVR-H3, así como la importancia de W100 en la inhibición de triptasa, como se mostró anteriormente, se utilizó una estrategia alternativa para mitigar la oxidación en W100. Se determinó la capacidad de los excipientes antioxidantes de reducir la oxidación de W100. En un ejemplo, las muestras se sometieron a AAPH 5 mM durante 24 horas a 40 °C, con o sin los ejemplos de excipientes antioxidantes, es decir, N-acetiltriptófano (NAT) 0.3 mM y metionina (Met) 5 mM en una formulación con polisorbato 20 al 0.02 %, succinato de arginina 200 mM (pH 5.5) y 150 mg/mL de anticuerpo hu31A.v11. El nivel de oxidación de W100 de CDR H3 y la potencia del anticuerpo se midieron a base del ensayo enzimático S-2288 cromogénico. Los datos de la Tabla 16 que figura a continuación muestran que, en este experimento, el estrés de AAPH produjo una oxidación de 38 % en W100 de hu31A.v11 IgG4, que llevó a una pérdida de potencia de 32 % en comparación con la muestra de anticuerpo no estresado de control (n=2). La composición de anticuerpos en la formulación con NAT 0.3 mM y Met 5 mM mostró una reducción del nivel de oxidación de 38 % a 26 % y una reducción de la pérdida de potencia de 32 % a 21 % (n=2). Por lo tanto, la formulación con excipientes antioxidantes tales como NAT y Met redujo la oxidación inducida por AAPH en W100 y restauró la potencia del

anticuerpo. En un ejemplo separado, la muestra se somete a condiciones de estrés de luz ambiental (60 horas a 5000 Lux/h, que es una condición de estrés más leve que AAPH) en la misma formulación con o sin los excipientes antioxidantes. La condición de estrés leve de luz ambiental tuvo como resultado un 6 % de oxidación en W100 y la presencia de los excipientes redujo adicionalmente el nivel de oxidación (Tabla 16). El nivel de oxidación inducido mediante el proceso de estrés inducido por luz ambiental no afectó la potencia del anticuerpo.

**Tabla 16: Efecto de formulación antioxidante sobre la oxidación de hu31A.v11**

| Descripción de la muestra                 | Potencia relativa promedio, (pérdida de potencia) (n=2) | Oxidación de HVR-H3 W100 |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------|
| Muestra de AAPH 5 mM sin NAT/MET          | 68 % (32 %)                                             | 38 %                     |
| Muestra de AAPH 5 mM, NAT 0,3 mM/MET 5 mM | 79 % (21 %)                                             | 26 %                     |
| Muestra estresada con luz, sin NAT/MET    | 100 % (0 %)                                             | 6 %                      |

En resumen, estos resultados muestran que el W100 de HVR-H3 de hu31A.v11 es inesperadamente susceptible a oxidación. Los datos de mutagénesis mostraron que W100 es importante para la afinidad de unión y actividad de inhibición del anticuerpo hu31A.v11, y ninguna de las variantes evaluadas de este residuo tenía una afinidad o actividad de inhibición comparable al hu31A.v11 de tipo salvaje. Pueden utilizarse antioxidantes tales como NAT y Met para mitigar la oxidación inesperada observada en W100 de HVR-H3 de hu31A.v11, por ejemplo, en formulaciones farmacéuticas de anticuerpo para el tratamiento de trastornos (por ejemplo, asma).

#### **Ejemplo 6: Inhibición de la actividad de triptasa in vivo del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11**

## A. Materiales y métodos

### (i) Ensayo ELISA de triptasa activa de cyno

5 Se determinó mediante un ensayo ELISA la concentración de triptasa activa de mono cynomolgus (cyno) (tetramero) en la muestra biológica, por ejemplo, líquido de lavado broncoalveolar (BAL). Se utilizó como anticuerpo de captura un anticuerpo monoclonal que reconoce la triptasa D1 de cyno. Se utilizó la triptasa D1 activa de cyno recombinante como el material original para la preparación de los estándares del ensayo. Los estándares del  
10 ensayo, controles y muestras diluidas se incubaron con 500 µg/ml inhibidor de tripsina de soja (SBTI; n.º catálogo de Sigma 10109886001) durante 10 minutos y luego se marcó con la sonda con base en actividad (ABP; G0353816) durante 1 hora. Ver Pan et ál. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:2882-85, 2006. Se utilizó SBTI para unirse al sitio activo en el monómero, lo que reduce cualquier fondo provocado por el monómero activo, una especie que puede  
15 formarse en condiciones específicas in vitro. El SBTI no puede unirse al sitio activo cuando la triptasa se encuentra en conformación tetramérica. Se agregó un inhibidor de triptasa de molécula pequeña (G02849855) durante 20 minutos para detener el marcado de ABP. Se agregó un anticuerpo disociante de tetrameros (por ejemplo, hu31A.v11 IgG4) durante 10 minutos para disociar los tetrameros marcados con ABP y no marcados. La mezcla se agregó  
20 a la placa de ELISA con un anticuerpo de captura durante 1 hora, se lavó con 1x PBST y se incubó con el reactivo SA-HRP (peroxidasa del rábano picante conjugada con estreptavidina, General Electric (GE), n.º de catálogo RPN4401V) durante 2 horas. Se generó una señal colorimétrica al aplicar sustrato de HRP, tetrametilbencidina (TMB) y se detuvo la reacción al agregar ácido fosfórico. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax® M5  
25 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) con 450 nm para absorbancia de detección y 650 nm para absorbancia de referencia. El ensayo tuvo un intervalo declarable de 20-0.04 ng/mL (dentro del pocillo) y se determinó que la concentración mínima cuantificable (MQC) del ensayo fue de 0.08 ng/mL en una dilución 1:2 de cyno BAL. Cada muestra de cyno individual se analizó en una única dilución por duplicado. Las muestras analizadas con una dilución  
30 mínima que se encontraron por debajo de la MQC se informaron como menores al límite declarable (LTR).

(ii) *Ensayo ELISA de triptasa total de cyno*

Se determinó mediante un ensayo ELISA la concentración de triptasa total de mono  
5 cynomolgus (cyno) en una muestra biológica, por ejemplo, BAL. Se utilizó como anticuerpo de  
captura un anticuerpo que reconoce la triptasa D1 de cyno. Se utilizó como anticuerpo de  
detección un anticuerpo que reconoce la triptasa D1 de cyno sin competir con un anticuerpo  
disociante de tetrámeros por la unión a triptasa D1 de cyno. Se utilizó la triptasa D1 activa de  
10 cyno recombinante como el material original para la preparación de los estándares del  
ensayo. Se agregó un anticuerpo disociante de tetrámeros (por ejemplo, hu31A.v11, IgG4)  
durante 10 minutos a los estándares de ensayo, controles y muestras diluidas con el fin de  
disociar cualquier tetrámero presente. Se agregó la mezcla a la placa de ELISA con  
anticuerpo de captura durante 2 horas y luego se lavó con 1x PBST. Se agregó el anticuerpo  
de detección biotinilado durante 1 hora. Luego, se agregó reactivo SA-HRP durante 1 hora. Se  
15 generó una señal colorimétrica mediante TMB y se detuvo la reacción al agregar ácido  
fosfórico. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax® M5 con 450 nm para  
absorbancia de detección y 650 nm para absorbancia de referencia. El ensayo tuvo un  
intervalo declarable de 20-0.02 ng/mL (dentro del pocillo) y se determinó que la MQC del  
ensayo fue de 0.08 ng/mL en una dilución 1:2 de cyno BAL. Cada muestra de cyno individual  
20 se analizó en una única dilución por duplicado. Las muestras analizadas con una dilución  
mínima que se encontraron por debajo de la MQC se informaron como menores al límite  
declarable (LTR).

(iii) *Ensayo ELISA de triptasa activa humana*

25

Se determinó concentración de triptasa activa humana (tetrámero) mediante un ensayo  
ELISA. Se utilizó como anticuerpo de captura el clon de anticuerpo monoclonal de ratón B12  
que reconoce triptasa humana y es capaz de disociar el tetrámero de triptasa (Fukuoka et ál.  
*supra*). También pueden utilizarse otros anticuerpos que se unen a la triptasa humana. Se  
30 purificó triptasa humana beta 1 activa recombinante y se utilizó como material original para la  
preparación de los estándares del ensayo. Los estándares del ensayo, controles y muestras

diluidas se incubaron con 500 µg/ml de SBTI durante 10 minutos y luego se marcaron con el ABP (G0353816) durante 1 hora. Se agregó un inhibidor de triptasa de molécula pequeña (G02849855) durante 20 minutos para detener el marcado de ABP. Esta mezcla se agregó a la placa de ELISA con anticuerpo de captura durante 1 hora, se lavó con 1x PBST y se incubó con reactivo SA-HRP durante 2 horas. Se generó una señal colorimétrica al aplicar TMB y se detuvo la reacción al agregar ácido fosfórico. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax® M5 con 450 nm para absorbancia de detección y 650 nm para absorbancia de referencia.

#### 10 (iv) Ensayo ELISA de triptasa total humana

Se determinó concentración de triptasa total humana mediante un ensayo ELISA. Se utilizó como anticuerpo de captura un anticuerpo (clon B12) que reconoce triptasa humana y es capaz de disociar el tetrámero de triptasa. Se utilizó como anticuerpo de detección un anticuerpo monoclonal que reconoce triptasa humana. Se purificó triptasa humana beta 1 activa recombinante y se utilizó como material original para la preparación de los estándares del ensayo. Se agregaron las mezclas a la placa de ELISA con anticuerpo de captura durante 2 horas y luego se lavó con 1x PBST. Se agregó el anticuerpo de detección biotinilado durante 1 hora. Luego, se agregó reactivo SA-HRP durante 1 hora. Se generó una señal colorimétrica al aplicar TMB y se detuvo la reacción al agregar ácido fosfórico. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax® M5 con 450 nm para absorbancia de detección y 650 nm para absorbancia de referencia.

#### B. Resultados

25

Para evaluar si los anticuerpos contra triptasa tales como hu31A.v11 se dirigen a la triptasa *in vivo* e inhiben la actividad de triptasa activa, se desarrolló un ensayo para medir la cantidad de triptasa activa presente en muestras tales como líquido de lavado broncoalveolar (BAL) (por ejemplo, de cyno) o tomadas a través de un método menos invasivo, tal como muestra nasal. Se desarrolló una sonda con base en actividad, que incluye un marcador (por ejemplo, biotina), un enlazador y un grupo reactivo que reacciona con la triptasa activa. Esta sonda se

30

une de forma selectiva y covalente a la triptasa activa. Ver Pan et ál. *supra*. Esta herramienta puede utilizarse para medir la cantidad de triptasa activa en la muestra (Figura 15). El procedimiento de recabación BAL implica la instilación de amortiguador en las vías aéreas y la recuperación posterior de este fluido (que puede ser variable) y, por lo tanto, es necesario un factor de normalización para comparar muestras entre puntos temporales y animales. Dado que la urea es una molécula pequeña con una difusión pasiva entre los compartimientos vasculares y de las vías aéreas, puede utilizarse la relación de urea en BAL/urea en suero para normalizar entre puntos temporales y entre animales. Ver Pinheiro de Oliveira et ál. 2010, *Critical Care* 14:R39.

10

Para determinar si la administración de hu31A.v11 se dirige a la triptasa in vivo, se administró una dosis de 30 mg/kg mediante inyección intravenosa a monos cyno saludables sin exposición y se determinó la cantidad de triptasa activa en BAL. Al inicio, los niveles de triptasa activa fueron relativamente bajos y variables entre animales. Se observó una tendencia de disminución de los niveles de triptasa activa en BAL luego de la administración de hu31A.v11 en animales con triptasa activa detectable al inicio (Figura 16).

15

20

25

30

El efecto de la administración de hu31A.v11 también se evaluó en un modelo de exposición a alérgenos en el cual los monos cyno se sensibilizan al gusano nemátodo parasítico *Ascaris* mediante repetición repetitiva a través de diversas vías (Figura 17). La fase de sensibilización incluyó la administración de *Ascaris* por vía intraperitoneal e intramuscular los días 0, 7, 15, 71, 78 y 85; mediante inhalación los días 29, 50, 120, 184 y 198-205; y por vía intramuscular al día 34 (Figura 17). Se evaluó la erupción de pápulas los días -7, 57 y 140 luego de la administración intradérmica en estos días. Cada animal recibió una dosis óptima de *Ascaris* según se determinó mediante ORD (dosis de respuesta óptima, por sus siglas en inglés), que se llevó a cabo para caracterizar los niveles de dosis adecuados de *Ascaris* para provocar una respuesta deseada en cada animal (llevada a cabo durante la fase de sensibilización). Las dosis incluyeron 4, 400 y 4000 µg/ml. La fase experimental incluyó una fase de vehículo, donde se administró vehículo el día 1, seguido por administración de *Ascaris* mediante inhalación el día 2, y luego muestreo de BAL y muestra nasal 30 minutos después para evaluar la cantidad de triptasa total y activa (Figura 17). Cuatro semanas después, la fase de

fármaco incluyó la administración de hu31A.v11 al día 1, seguida por administración de *Ascaris* el día 2 y luego muestreo de BAL y muestra nasal 30 minutos después para evaluar la cantidad de triptasa total y activa (Figura 17).

- 5 En el modelo de sensibilización con *Ascaris*, la administración del anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 llevó a una disminución significativa de triptasa activa en BAL en 5 animales con niveles de triptasa activa detectables al inicio (Figura 18A), lo que indica que este anticuerpo inhibe la actividad de triptasa *in vivo*. Además, la administración del anticuerpo contra triptasa también llevó a un aumento de la cantidad de triptasa total en BAL en todos los animales  
10 (Figura 18B). Otros experimentos mostraron que el nivel de triptasa total en líquido de la membrana mucosa (MLF) aumentó luego de dosificar el anticuerpo contra triptasa hu31A.v11, según se evaluó mediante el nivel de triptasa total en la muestra nasal (Figura 18C). En este experimento, se recogió el MLF mediante el uso de una matriz de absorción sintética (SAM; Hunt Developments (UK), Ltd, West Sussex, Inglaterra). El aumento de triptasa total luego de  
15 la dosificación indica un acoplamiento objetivo. La triptasa activa no fue detectable en la muestra nasal antes y después de la dosificación. El \* en las Figuras 18A y 18C indica niveles por debajo de la detección.

- Luego, también se evaluó la prueba de actividad *in vivo* en ratones NOD-SCID IL2Rgnull-  
20 3/GM/SF con injertos humanos. Se desarrolló anteriormente un modelo de ratón humanizado para respuestas alérgicas dependientes de IgE humana e injerto de mastocitos humanos. En resumen, se desarrollaron ratones NSG-SGM3 (Jackson Laboratory, n.º 013062) a partir del fondo NOD.Cg-*Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ* (NSG) y, al igual que sus progenitores NSG, los ratones NSG-SGM3 no poseen linfocitos B, linfocitos T maduros y linfocitos citolíticos funcionales, y  
25 presentan deficiencias en la señalización de citocina de ratón. Estos ratones contienen tres transgenes coinyectados, cada uno impulsado por una secuencia promotora/potenciadora de citomegalovirus humano. Los ratones NSG-SGM3 transgénicos triples producen de forma constitutiva niveles en suero de 2-4 ng/ml de SCF humano, GM-CSF e IL-3, lo que proporciona señales de proliferación y supervivencia celular (ver, por ejemplo, Bryce et ál. *J. Allergy Clin Immunol.* 138(3):769-779, 2016). Los ratones NSG-SGM3 BLT desarrollan  
30 mastocitos humanos que pueblan los tejidos linfoides periféricos, tejidos de la mucosa y la

cavidad peritoneal. Los mastocitos humanos en ratones NSG-SGM3 BLT expresan CD117, triptasa y receptor de IgE, y pueden someterse a flujo de calcio y desgranularse de forma específica al antígeno dependiente de IgE. Al exponerse, los ratones NSG-SGM3-BLT desarrollan una respuesta de anafilaxis sistémica pasiva mediada por IgE específica al antígeno y dependiente de mastocitos celulares, que puede analizarse al medir cambios en la temperatura corporal.

El experimento se diseñó para examinar la capacidad de los anticuerpos contra triptasa de inhibir la anafilaxis sistémica pasiva mediada por IgE en los ratones injertados. Los ratones NSG-SGM3 con 10-12 semanas de vida (Jackson Laboratory n.º 013062) se dividieron en tres grupos: Grupo 1: Los ratones NSG-SGM3 se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) con anticuerpo isotípico (500 µg/ratón); Grupo 2: Los ratones NSG-SGM3 se trataron con anticuerpo contra triptasa humana (hu31A.v11 IgG4, 13.3 mg/mL) i.p. (500 µg/ratón); y Grupo 3: Los ratones NSG-SGM3 se trataron con inhibidor de molécula pequeña de triptasa G02849855 (30 mg/kg) i.p. Al día -1, se afeitó el vello abdominal de todos los ratones para facilitar la medición de la temperatura corporal. Al día 0, se inyectó a los animales anticuerpo isotípico de control o anticuerpo contra triptasa. El volumen de la dosis se formuló en 100 µL. El anticuerpo contra triptasa se disolvió en 200 µL de solución salina para inyección. 15 minutos después del tratamiento, los ratones de los Grupos 1-3 se sensibilizaron por vía intravenosa con IgE contra NP (4-hidroxi-3-nitrofenilacetilo hapteno) JW8.5.13 (Sigma, n.º de catálogo 87080706-1VL; ver también US20070253948 y Jackman et ál. *J. Biol. Chem.* 285(27):20850-20859, 2010), 1.6 µg en 200 µL de solución salina. Al día 1 (24 horas después del tratamiento), se midió la temperatura corporal al sujetar manualmente a los ratones y colocar un Braun ThermoScan® Pro 4000 firmemente contra la piel abdominal afeitada poco debajo del esternón. Inmediatamente después de la medición inicial de temperatura corporal, los ratones se expusieron i.v. con 500 µg del antígeno NP conjugado a una proteína portadora BSA (NP-BSA) en 200 µL de solución salina. Cada 15 minutos después de la exposición, se mide la temperatura corporal durante al menos 60 minutos.

Tal como se muestra en la Figura 19, los ratones tratados con el anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 mostraron un mejor mantenimiento de la temperatura corporal en comparación con

los ratones tratados con un anticuerpo contra gD de control, tras exposición a IgE.

Estos datos muestran que el anticuerpo contra triptasa hu31A.v11 es activo y puede unir e inhibir la actividad de triptasa *in vivo*. Estos datos proporcionan evidencia adicional de que pueden utilizarse anticuerpos contra triptasa tales como hu31A.v11 como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos asociados a la triptasa, tales como asma.

### Otras modalidades

Si bien la invención que antecede se describió de forma detallada a modo ilustrativo y de ejemplo con fines de claridad de comprensión, las descripciones y los ejemplos no deberían interpretarse como taxativos del alcance de la invención. Las descripciones de todas las patentes y bibliografía científica citadas en la presente se incorporan de forma expresa en su totalidad mediante esta referencia.

### IV. Listado de secuencias

La Tabla 17 muestra secuencias que se utilizan en toda la solicitud.

**Tabla 17: Listado de secuencias**

| SEQ ID<br>NO: | Secuencia                                                                                                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1             | X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> GMX <sub>3</sub> , donde X <sub>1</sub> es Asp o Ser, X <sub>2</sub> es Tyr o Phe, y X <sub>3</sub> es Val o His      |
| 2             | FISSGSSTVYYADTMKG                                                                                                                                   |
| 3             | RX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> DWYFDV, donde X <sub>1</sub> es Asn o Asp, X <sub>2</sub> es Tyr o Asn, y X <sub>3</sub> es Asp o Tyr |
| 4             | SASSSVTYMY                                                                                                                                          |

5

10

15

20

25

30

|    |                                                                                                                                    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | RTSDLAS                                                                                                                            |
| 6  | QHYHSYPLT                                                                                                                          |
| 7  | DYGMV                                                                                                                              |
| 8  | RNYDDWYFDV                                                                                                                         |
| 9  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLE<br>WVAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY<br>YCTRRNYDDWYFDVWGQGT LVTVSS  |
| 10 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWI<br>YRTSDLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQHYHSYPL<br>TFGQG TKVEIK               |
| 11 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS                                                                                                     |
| 12 | WVRQAPGKGLEWVA                                                                                                                     |
| 13 | RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR                                                                                                  |
| 14 | WGQGT LVTVSS                                                                                                                       |
| 15 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC                                                                                                            |
| 16 | WYQQKPGKSPKPWIY                                                                                                                    |
| 17 | GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC                                                                                                  |
| 18 | FGQG TKVEIK                                                                                                                        |
| 19 | EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMVWVRQAPGKGLE<br>WVAFISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN PKNTLFLQMSSLRSED TAMY<br>YCARRDNYDWYFDVWG TGTTVTVSS |

|    |    |                                                                                                                                    |
|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 20 | QIVLTQSPAIMASASPGEKVTISCSASSSVTYMYWYQQKPGSSPKPWIYRTSD<br>LASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQHYHSYPLTFGAGTKLE<br>LK                |
|    | 21 | EVKLVESGGGSVQPGGSRKLSCAASGFTFS                                                                                                     |
|    | 22 | WVRQAPGKGLEWVA                                                                                                                     |
|    | 23 | RFTISRDNPKNTLFLQMSSLRSEDAMYYCAR                                                                                                    |
|    | 24 | WGTGTTVTVSS                                                                                                                        |
| 10 | 25 | QIVLTQSPAIMASASPGEKVTISC                                                                                                           |
|    | 26 | WYQQKPGSSPKPWIY                                                                                                                    |
|    | 27 | GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC                                                                                                   |
|    | 28 | FGAGTKLELK                                                                                                                         |
|    | 29 | RDNYDWYFDV                                                                                                                         |
| 15 | 30 | GYAIT                                                                                                                              |
|    | 31 | GISSAATTFYSSWAKS                                                                                                                   |
|    | 32 | DPRGYGAALDRLDL                                                                                                                     |
|    | 33 | QSIKSVYNNRLG                                                                                                                       |
|    | 34 | ETSILTS                                                                                                                            |
| 20 | 35 | AGGFDRSGDTT                                                                                                                        |
|    | 36 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGA<br>ALDRLDLWGQGTLVTVSS |
|    | 37 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYET<br>SILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAGGFDRSGDITFGQG<br>TKVEIK             |
|    |    |                                                                                                                                    |
|    |    |                                                                                                                                    |
| 25 |    |                                                                                                                                    |
|    |    |                                                                                                                                    |
|    |    |                                                                                                                                    |
|    |    |                                                                                                                                    |
|    |    |                                                                                                                                    |

5

10

15

20

25

|    |                                                                                                                                                                                                                      |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 38 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLI                                                                                                                                                                                       |
| 39 | WX <sub>1</sub> RQPPGKGLEWIG, donde X <sub>1</sub> es Ile o Val                                                                                                                                                      |
| 40 | RX <sub>1</sub> TISX <sub>2</sub> DTSKNQX <sub>3</sub> SLKLSSVTAADTAVYX <sub>4</sub> CAR, donde X <sub>1</sub> es Val o Ser, X <sub>2</sub> es Arg o Val, X <sub>3</sub> es Val o Phe, y X <sub>4</sub> es Tyr o Phe |
| 41 | WGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                                                          |
| 42 | WIRQPPGKGLEWIG                                                                                                                                                                                                       |
| 43 | RVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCAR                                                                                                                                                                                     |
| 44 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLI                                                                                                                                                                                       |
| 45 | WVRQAPGKGLEWIG                                                                                                                                                                                                       |
| 46 | RSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCAR                                                                                                                                                                                     |
| 47 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAA<br>LDRLDLWGQGTTLTVSS                                                                                   |
| 48 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWVRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRSTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYFCARDPRGYGAA<br>LDRLDLWGQGTTLTVSS                                                                                   |
| 49 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISVDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAA<br>LDRLDLWGQGTTLTVSS                                                                                   |
| 50 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGAA<br>LDRLDLWGQGTTLTVSS                                                                                   |

|    |    |                                                                                                                                    |
|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 51 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSRFSLIGYAITWVRQAPGKGLEWIG<br>GISSAATTFYSSWAKSRSTISRDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYFCARDP<br>RGYGAALDRLDLWGQGTLVTVSS |
|    | 52 | QSLEESGGGLFKPTDTLTCTVSRFSLIGYAITWVRQSPENGLEWIGGIS<br>SAATTFYSSWAKSRSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCARDPRGY<br>GAALDRLDLWGQGTLVTVSS    |
|    | 53 | AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLIY<br>ETSILTSGVPSRFKGSSETQFTLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDTT<br>FGGGTEVVVK              |
| 10 | 54 | QSLEESGGGLFKPTDTLTCTVSRFSLI                                                                                                        |
|    | 55 | WVRQSPENGLEWIG                                                                                                                     |
|    | 56 | RSTITRNTNENTVTLKMTSLTAADTATYFCAR                                                                                                   |
| 15 | 57 | WGQGTLVTVSS                                                                                                                        |
|    | 58 | DAQLTQSPSSLSASVGDRVITTCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKPPKLLIY<br>ETSILTSGVPSRFSGSGSETDFTLTISLQPEDFATYFCAGGFDRSGDTTF<br>GQGTKVEIK              |
|    | 59 | AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGQPPKLLIY<br>ETSILTSGVPSRFKGSSETQFTLTISDVQADDAATYFCAGGFDRSGDTT<br>FGGGTEVVVK              |
| 20 | 60 | $DX_1QX_2TQSPSSLSASVGDRVITTC$ , donde $X_1$ es Ile o Ala, y $X_2$ es Met o<br>Leu                                                  |
|    | 61 | WYQQKPGKX1PKLLIY, donde X1 es Ala o Pro                                                                                            |

|    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 62 | GVPSRFSGSGSX <sub>1</sub> TDFTLTISLQPEDFATYX <sub>2</sub> C, donde X <sub>1</sub> es Gly o Glu, y X <sub>2</sub> es Tyr o Phe                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 63 | FGQGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 64 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 65 | WYQQKPGKAPKLLIY                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 10 | 66 | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 67 | AAVLTQTPASVSAAVGGTVSISC                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 68 | WYQQKPGQPPKLLIY                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 69 | GVPSRFKSGSSETQFTLTISDVQX <sub>1</sub> DDAATYFC, donde X <sub>1</sub> es Cys o Ala                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 15 | 70 | FGGGTEVVK                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 71 | MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVH<br>GPYWMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQL<br>LPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPC<br>WVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVR<br>DDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWE GEGCAQPNRP<br>GIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    |    | 72                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVH<br>GPYWMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQL<br>LPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVKVSSHVHTVTLPPASETFPPGMPC<br>WVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVR<br>DDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWE GEGCAQPNRP<br>GIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP |

|    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|----|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 73 | MLNLLLLALPVLASRAYAAPAPGQALQRVGIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVR<br>DRYWMHFCCGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQL<br>LPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLEELPEVNVSSHVHTVTLPPASETFPFGMPC<br>WVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVR<br>DDMLCAGNTRRDSCQVATAPHTFPAPS                                                                                                                                                                                                                                     |
|    | 74 | GATGGTGACTGTTCCAGTTGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|    | 75 | CATTGGTGAGGGTGCCCGAGTTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 10 | 76 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYGMVWVRQAPGKGLEWVA<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRNY<br>DDWYFDWVGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV<br>NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 15 |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 20 |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 25 | 77 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKWIYRTS<br>DLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKV<br>EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                             |

|    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 78 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMVWRQAPGKGLEWVA<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRNY<br>DDWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV<br>DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP<br>EVTCTVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL<br>TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG    |
| 15 | 79 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPIYRTS<br>DLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKV<br>EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 20 | 80 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGA<br>ALDRDLWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<br>PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV<br>N HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS<br>RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS<br>VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE<br>EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY<br>SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 25 |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

|    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 81 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYET<br>SILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGFDRSGDITFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNA<br>LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP<br>VTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 10 | 82 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSRFSLIGYAITWIRQPPGKGLEWIGGISS<br>AATTFYSSWAKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARDPRGYGA<br>ALDRDLWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP<br>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVPSSSLGTKYTCNV<br>DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE<br>VTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM<br>TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL<br>TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG |
| 20 | 83 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSIKSVYNNRLGWYQQKPGKAPKLLIYET<br>SILTSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCAGGFDRSGDITFGQG<br>TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNA<br>LQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP<br>VTKSFNRGEC                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 25 | 84 | AYSVN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|    | 85 | MIWGDGKIVYNSALKS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|    | 86 | DGYYPYAMDN                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|    | 87 | RASKSVDSYGNSFMH                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

|    |    |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 88 | LASNLES                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|    | 89 | QQNNEDPRT                                                                                                                                                                                                                                                               |
|    | 90 | QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIW<br>GDGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCAGDGYYPYA<br>MDNWWGQGS�TVSS                                                                                                                                           |
| 10 | 91 | DIVMTQSPDLSVSLGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLL<br>IYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTFG<br>GGTKVEIK                                                                                                                                                  |
|    | 92 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS<br>SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYSPFTFGQGTK<br>VEIK                                                                                                                                                      |
| 15 | 93 | EVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQPPGKGLEWIG<br>YIYYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARFDYW<br>GQFTLVTVSS                                                                                                                                                |
|    | 94 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVG<br>AISSSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFDY<br>WGQGTLTVSS                                                                                                                                                |
| 20 | 95 | TLTISSLQPEDFATYYCQQYYSPFTFGQGTKVEIK                                                                                                                                                                                                                                     |
|    | 96 | TLTISDVQCDDAATYFCAGGFDRSGDTTFGGGTEVVK                                                                                                                                                                                                                                   |
|    | 97 | IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGS LIHPQWVLTAAHCVGPD<br>VKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNV<br>SSHVHTVTLPPASETFPPGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIME<br>NHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSSGGLVCKVNG<br>TWLQAGVVS WGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP |

|    |     |                                                                                                                                  |
|----|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 98  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGLEWVG<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDN<br>YDWYFDVWGQGTLVTVSS  |
|    | 99  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGLEWVA<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDN<br>YDWYFDVWGQGTLVTVSS  |
| 10 | 100 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVA<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRDN<br>YDWYFDVWGQGTLVTVSS |
| 15 | 101 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVRQAPGKGLEWVA<br>FISSGSSTVYYADTMKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCTRRDN<br>YDWYFDVWGQGTLVTVSS  |
| 20 | 102 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKAPKLLIYRTSD<br>LASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVE<br>IK                |
|    | 103 | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVTYMYWYQQKPGKSPKPWIYRTSD<br>LASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQHYHSYPLTFGQGTKVE<br>IK                |

|                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div data-bbox="73 436 97 468">5</div> <div data-bbox="240 552 297 583">104</div>                                               | GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGG<br>CAGCCTGCGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTA<br>TGGCATGGTGTGGGTGCGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGG<br>TGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCACCGTGTATTATGCCGATACCAT<br>GAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAAACACCCTGTAT<br>CTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCCGTGTATTATTGCA<br><div data-bbox="61 709 97 741">10</div> CCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCA<br>CCCTGGTGACCGTCTCGAGT |
| <div data-bbox="61 982 97 1014">15</div> <div data-bbox="240 1056 297 1087">105</div> <div data-bbox="61 1255 97 1287">20</div> | GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGC<br>GATCGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTATATG<br>TATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAAGCCCCAAAACCATGGATCTATC<br>GCACCAGCGATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGC<br>GGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAA<br>GATTTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATCACAGCTATCCACTGACCTT<br><div data-bbox="61 1528 97 1560">25</div> CGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA                                        |

5

10

15

20

25

30

106

GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTG  
 CGCCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTATGGCATGGTGTGGG  
 TCGGCCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCA  
 GCAGCACCGTGTATTATGCCGATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGAT  
 AACAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGC  
 CGTGTATTATTGCACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTTCGATGTGTGGGGCC  
 AGGGCACCCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC  
 CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT  
 GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTG  
 ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT  
 CAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC  
 AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC  
 TTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA  
 CCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC  
 CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG  
 TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG  
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA  
 GGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA  
 GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG  
 TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGAC  
 CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT  
 GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCT  
 CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA  
 CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA  
 GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

5

10

15

20

107

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGC  
GATCGCGTGACCATCACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACCTATATGT  
ATTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAAGCCCCAAAACCATGGATCTATCG  
CACCAGCGATCTGGCCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGG  
CAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAAGAT  
TTCGCCACCTATTATTGCCAGCACTATCACAGCTATCCACTGACCTTCGG  
CCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTC  
TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTCTTCTGT  
TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG  
AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAG  
AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC  
TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC  
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA  
GTGT

25

5

10

15

20

25

108

GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCAGCCTGCG  
 CCTGAGCTGCGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCGATTATGGCATGGTGTGGGTGCG  
 CCAGGCCCCAGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGGCCTTCATCAGCAGCGGCAGCAGCAC  
 CGTGTATTATGCCGATACCATGAAAGGCCGCTTCACCATCAGCCGCGATAACAGCAAAA  
 ACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCCGAAGATACCGCCGTGTATTATTG  
 CACCCGCCGCAACTACGATGATTGGTATTTTCGATGTGTGGGGCCAGGGCACCTGGTG  
 ACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTGCTCCC  
 GCAGTACTTCTGAGTCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA  
 ACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC  
 GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCT  
 AGCAGCTTGGGCACCAAGACCTACACGTGCAACGTGGATCACAAGCCCAGCAACACCA  
 AGGTGGACAAACGCGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCACC  
 TGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAACCCAAGGACACTCTC  
 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGAC  
 CCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA  
 AGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCC  
 TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCT  
 CCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAG  
 GTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT  
 GCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC  
 AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCA  
 TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGT  
 CTCTGGGTAAA

10

109

GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCAGGCCTGGTGAAACCAAGCGA  
AACCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCT  
ATGCCATCACCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGG  
ATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCACCTTCTATAGCAGCTGGGC  
CAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAAACCAGGTGA  
GCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTATT  
GCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATCGCCTGGAT  
CTGTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTCTCGAGT

15

20

110

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGG  
CGATCGCGTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAGCGTGTATAACAA  
CCGCCTGGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAACCTGC  
TGATCTATGAAACCAGCATCCTGACCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCA  
GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTG  
CAGCCAGAAGATTTGCCACCTATTATTGCGCCGGCGGCTTCGATCGC  
AGCGGCGATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAA

25

25

5

10

15

20

25

111

GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCAGGCCTGGTGAAACCAAGCGAAACCCTGAG  
 CCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCTATGCCATCACCTGGATCCG  
 CCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCA  
 CCTTCTATAGCAGCTGGGCCAAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAA  
 ACCAGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTATT  
 GCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATCGCCTGGATCTGTGGGGC  
 CAGGGCACCCCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCC  
 CCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA  
 GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
 GCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA  
 ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA  
 AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCT  
 TCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA  
 CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG  
 TGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC  
 AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC  
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC  
 ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC  
 CGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT  
 CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA  
 GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC  
 CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA  
 GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

5

10

15

20

25

112

GATATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGC  
 GATCGCGTGACCATCACCTGCCAGAGCATCAAAGCGTGTATAACAACC  
 GCCTGGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGCAAAGCCCCAAAAGTCTGAT  
 CTATGAAACCAGCATCCTGACCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCGGC  
 AGCGGCAGCGGCACCGATTTACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCA  
 GAAGATTTGCCACCTATTATTGCGCCGGCGGCTTCGATCGCAGCGGCG  
 ATACCACCTTCGGCCAGGGTACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGC  
 TGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG  
 GAACTGCTTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC  
 AAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG  
 AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCA  
 GCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC  
 CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC  
 AACAGGGGAGAGTGT

5

10

15

20

25

113

GAAGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGCCAGGCCTGGTGAACCAAGCGAAACCCTGAG  
 CCTGACCTGCACCGTGAGCCGCTTCAGCCTGATCGGCTATGCCATCACCTGGATCCG  
 CCAGCCACCAGGCAAAGGCCTGGAATGGATCGGCGGCATCAGCAGCGCCGCCACCA  
 CTTCTATAGCAGCTGGGCCCCAAAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGATACCAGCAAAA  
 ACCAGGTGAGCCTGAAACTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGATACCGCCGTGTATTATT  
 GCGCCCGCGATCCACGCGGCTATGGCGCCGCCCTGGATCGCCTGGATCTGTGGGGC  
 CAGGGCACCTGGTGACCGTCTCGAGTGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC  
 CCTGGCACCTGCTCCCGCAGTACTTCTGAGTCCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG  
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA  
 GCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA  
 GCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCAAGACCTACACGTGCAACGTGG  
 ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAACGCGTTGAGTCCAAATATGGTCCCC  
 CATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCC  
 CCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGG  
 TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGC  
 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTA  
 CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT  
 ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAA  
 AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGG  
 AGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCG  
 ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG  
 CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGAC  
 AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG  
 CACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAA

|     |                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 114 | EVTLRESGPALVKPTQTLTLCTVSGFSLSAYSVNWIRQPPGKALEWLAMIWG<br>DGKIVYNSALKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCAGDGYYPYAMD<br>NWGQGSLVTVSS                                                                                                                                                      |
| 115 | DIVLTQSPDSLVSLSGERATINCRASKSVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIY<br>LASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQNNEDPRTFGGG<br>TKVEIK                                                                                                                                                           |
| 116 | IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCCGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVK<br>DLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVKVSSH<br>VHTVTLPPASETFPPGMPWCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHIC<br>DAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQA<br>GVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK |
| 117 | IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVDRYWMHFCCGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVK<br>DLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIVHPQFYTAQIGADIALLELEEPVNVSSH<br>VHTVTLPPASETFPPGMPWCWVTGWGDVDNDERLPPPFPLKQVKVPIMENHIC<br>DAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSGGPLVCKVNGTWLQA<br>GVVSWGEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK  |
| 118 | IVGGQEAPRSKWPWQVSLRVDRYWMHFCCGSLIHPQWVLTAAHCLGPDVK<br>DLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIVHPQFYIIQTGADIALLELEEPVNISSRV<br>HTVMLPPASETFPPGMPWCWVTGWGDVDNDEPLSPPFPLKQVKVPIMENHICD<br>AKYHLGAYTGDDVRIIRDMLCAGNSQRDSCKGDSGGPLVCKVNGTWLQAG<br>VVSWEDEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKPGNSDYKDDDDK  |

|    |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5  | 119 | ALPVLVSPAHAAPAPGQALQRVGIVGGKEAPRSKWPWQVSLRLHGQYWMHFC<br>GGSLIHPQWVLTAAHCVGPDVKDLADLRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQF<br>YAVQIGADIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPALETFPFGTPCWVTGWGDVDNDV<br>RLPPPYPLKEVEVPIVENQLCDAEYHTGLHTGDSFRIVRDDMLCAGSEKHDSCQ<br>GDSGGPLVCKVNGTWLQAGVVSWECEGALPNRPGIYTRVTYYLDWIHRYVPE<br>KP |
| 10 | 120 | SFSMS                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|    | 121 | TISGGKTFTDYVDSVKG                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|    | 122 | ANYGNWFFEY                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|    | 123 | RASESVAKYGLSLLN                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 15 | 124 | AASNRGS                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|    | 125 | QQSKEVPFT                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 20 | 126 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVATIS<br>GGKTFTDYVDSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRANYGNWF<br>FEWVGQGTTLTVSS                                                                                                                                                                  |
|    | 127 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVAKYGLSLLNWFQQKPGQPPRLLIFAA<br>SNRSGSIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQSKEVPFTFGQGTKVEI<br>K                                                                                                                                                                          |
| 25 | 128 | AGSTHHHHHHDDDDKIVGGQEAPRSKWPWQVSLRVHGPYWMHFCGGSLIHP<br>QWVLTAAHCVGPDVKDLAALRVQLREQHLYYQDQLLPVSRIIVHPQFYTAQIGA<br>DIALLELEEPVNVSSHVHTVTLPPASETFPFGMPCWVTGWGDVDNDERLPPPF<br>PLKQVKVPIMENHICDAKYHLGAYTGDDVRIVRDDMLCAGNTRRDSCQGDSSG<br>PLVCKVNGTWLQAGVVSWECEGCAQPNRPGIYTRVTYYLDWIHHYVPKKP            |
| 30 |     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |