

ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-IL-5R α

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a la biotecnología, en particular a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y a su uso. Más específicamente, la presente invención se refiere a cuerpos monoclonales que específicamente se unen a IL-5R α (cadena α del receptor de interleucina 5). La invención también se refiere a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o a fragmento de unión al antígeno del mismo, un vector de expresión, un método para preparar dicho anticuerpo y el uso de dicho anticuerpo en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados con IL-5R α .

Antecedentes de la Invención

La interleucina 5 (IL-5), una citoquina proinflamatoria, el grupo factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos, que es una proteína de cuatro hélices. La interleucina 5 es generalmente producida por células Th2 y mastocitos. La IL-5 estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos B activados, induce un cambio de la síntesis de inmunoglobulinas a IgA. Muchas funciones de los eosinófilos y los basófilos están mediadas por la acción de la interleucina-5 (IL-5). Se sabe que la IL-5 promueve la diferenciación y activación de los eosinófilos, y también aumenta su viabilidad mediante la inhibición de la apoptosis [Lotvall J., Pullertis T. *Treating asthma with Anti-IgE or Anti IL-5. Curr Pharm Des.* 1999; 5:757–70 y Kolbeck R., Kozhich A., Koike M. *et al. Medi-563, a humanized anti-IL-5 receptor alpha mAb with enhanced antibody-dependent cell mediated cytotoxicity function.* J Allergy Clin Immunol. 2010;125 (1):1344–53].

La IL-5 actúa a través de un receptor específico (IL-5R) expresado en precursores de eosinófilos/basófilos y en eosinófilos/basófilos maduros humanos. La IL-5R consta de una única cadena α (IL-5R α /CD125, dominio extracelular) y de un receptor de la cadena β común de IL-3/GM-CSF (bc/CD131), que a su vez no se une a un ligando, pero aumenta la afinidad de IL-5 al receptor homónimo y participa directamente en la transducción de señales. [Tetsuya A., Rafeul A. *The mechanism of IL-5 signal transduction.* American Journal of Physiology - Cell Physiology Publicado el 1 de septiembre de 1998 Vol. 275 no. 3, C623-C633].

El desarrollo de la eosinofilia se asocia con la expresión selectiva de IL-5R en células precursoras de eosinófilos en la médula ósea. Por lo tanto, la inhibición de la interacción entre la IL-5 y su receptor celular parece ser la más preferida para suprimir la eosinofilia.

La importancia terapéutica de la supresión de la eosinofilia se debe a los altos niveles de granulocitos eosinófilos en una serie de procesos patológicos. Por lo tanto, un aumento en el recuento de eosinófilos en el tracto respiratorio en pacientes con asma bronquial, y en el epitelio

esofágico en pacientes con esofagitis eosinófila está en la base de la fisiopatología de dichas enfermedades. Los eosinófilos liberan mediadores proinflamatorios, como la proteína catiónica eosinófila (ECP) y los leucotrienos.

Un anticuerpo monoclonal benralisumab que ya se conoce de la técnica anterior, se une a IL-5R α y, por lo tanto, inhibe la interacción del receptor con un ligando. Este anticuerpo monoclonal agota significativamente los eosinófilos en la sangre y el tejido pulmonar. Benralizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado (IgG1/k) derivado de un anticuerpo murino producido mediante la tecnología de hibridoma [Koike M., Nakamura K. et.al. *Establishment of humanized anti-interleukin-5 receptor alpha chain monoclonal antibodies having a potent neutralizing activity*. Hum Antibodies 2009, 18(1-2):17-27]. Dicho anticuerpo se une con alta afinidad (KD = 11 pm) a la IL-5R α e inhibe la proliferación celular dependiente de IL-5 (CI50 = 0.3 nm) [Kolbeck R., Kozhich A et.al. *MEDI-563, a humanized anti-interleukin 5 receptor-alpha monoclonal antibody, with enhanced antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity function*. J Allergy Clin Immunol 2010, 125(6): 1344-53.e2]. Benralizumab se produce en una línea celular afucosilada, y la ausencia de fucosa en el núcleo de oligosacárido conseguida de esta manera produce una mejoría de 5 a 10 veces en la unión a Fc γ RIIIa humana soluble, y por lo tanto aumenta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [Shinkawa T., Nakamura K. et al.] La ausencia de fucosa pero no la presencia de galactosa o bisectrices de N-acetilglucosamina de los oligosacáridos de tipo complejo IgG1 humano demuestran el papel importantísimo de mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. [J Biol Chem 2003, 278(5):3466-73]. Dicho anticuerpo se encuentra en ensayos clínicos de fase 3. El anticuerpo benralizumab ha sido descrito en la solicitud internacional WO9710354 (A1).

En el arte anterior también se conoce un cuerpo bispecífico que se une a la IL-5R y a CD3e (ND003) humano. Dicho anticuerpo se encuentra en la etapa de investigación pre-clínica y ha sido descrito en las solicitudes internacionales WO2015172800 y WO2015058861.

De lo dicho anteriormente surge la importancia de la creación de nuevos anticuerpos que se unan efectivamente a IL-5R α e inhiban la activación mediada por IL-5R α .

Hemos desarrollado un anticuerpo monoclonal mAb (BCD-133) completamente humano, que se une a IL-5R α humana con una afinidad comparable a la de benralizumab e inhibe la activación mediada por IL-5R α . Como sucede con benralizumab, BCD-133 ha mejorado la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, permitiendo así la activación de una respuesta inmunitaria a las células que llevan el receptor de IL-5. El anticuerpo BCD-133 se une selectivamente a IL-5R α y es un inhibidor efectivo de la activación mediada por IL-5R α de células inmunocompetentes y de la inflamación específica asociada a ello. Un ensayo celular muestra actividad del anticuerpo BCD-133 que excede la acción del benralizumab. Además, BCD-133 es un anticuerpo completamente humano obtenido *de novo*; este hecho permite reducir el riesgo de

inmunogenicidad y no requiere más transformaciones genéticas dirigidas a aumentar la afinidad con una proteína humana, lo que puede conducir a la pérdida de afinidad de unión.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a moléculas de unión, por ejemplo, anticuerpos dirigidos a la unión a IL-5R α . Dichos anticuerpos pueden usarse para tratar una enfermedad o trastorno mediado por la interacción de IL-5 y su receptor celular.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a IL-5R α y comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a la secuencia de SEQ ID. NO: 3 y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80% homóloga a la secuencia de la SEC ID NO: 8, es decir que las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID NO: 3 y 8 pueden comprender 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 3.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo contiene un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de la SEC. ID NO: 8.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 80% homólogas a las secuencias de las SEC ID NO: 1-3, es decir, las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NO: 1-3 pueden comprender 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID NOs: 1-3.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos que son por lo menos un 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 6-8, es decir, las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID NOs: 6-8 pueden comprender 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID NOs: 6-8.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias que son por lo menos un 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 1-3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende secuencias de aminoácidos que son por lo menos un 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 6-8, es decir, las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID NOs: 1-3 y 6-8 pueden comprender 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID NOs: 1-3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID NOs: 6-8.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 11-12, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionados de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 13-14.

En una realización, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 11-12, y una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 13-14.

En un modo de realización, un anticuerpo específico para IL-5R α es un anticuerpo IgG de longitud completa.

En una realización, el anticuerpo monoclonal de IgG de longitud completa específico de IL-5R α es de isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En una realización, el anticuerpo monoclonal de IgG de longitud completa específico de IL-5R α es de isotipo IgG1 humano.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

En una realización, un ácido nucleico es ADN.

En una realización, un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de un anticuerpo y que es al menos un 90% homóloga a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 15-16, y/o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo y es al menos un 90% homóloga a una secuencia seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NOs: 17-18.

En una realización, un ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de anticuerpos, seleccionándose dicha cadena pesada del grupo que comprende las SEC ID NO: 15-16, y/o una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC ID NO: 17-18, que codifica la cadena ligera de un anticuerpo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una célula huésped que se usa para producir dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende la transformación de una célula con dicho vector.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped que se usa para preparar dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, y comprende dicho ácido nucleico.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo y comprende el cultivo de dicha célula huésped en un medio de crecimiento en condiciones suficientes para producir dicho anticuerpo, si es necesario, seguido de aislamiento y purificación de los anticuerpos obtenidos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica usada para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , que comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización, una composición farmacéutica está destinada a la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , dicha enfermedad o trastorno está dentro de una selección que incluye asma, por ejemplo, asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, eosinofila grave, asma (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); Síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; gastroenteritis eosinofílica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una combinación farmacéutica destinada a ser usada en la prevención o tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α ; dicha combinación farmacéutica comprende dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, y por lo menos un compuesto activo terapéuticamente diferente.

En una realización, una combinación farmacéutica está destinada a ser usada para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , dicha enfermedad o trastorno se selecciona de asma, por ejemplo, asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinofila grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; gastroenteritis eosinofílica.

En una realización, una combinación farmacéutica comprende un compuesto terapéuticamente activo que se selecciona de entre una molécula pequeña, un anticuerpo u hormonas esteroideas, como los corticosteroides.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para inhibir la actividad biológica de IL-5R α en un sujeto que necesita tal inhibición; dicho método comprende administrar una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α ; dicho método comprende administrar en un sujeto que necesita dicho tratamiento dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o dicha composición farmacéutica, en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En una realización, la enfermedad o trastorno se selecciona de: tipos de asma, por ejemplo, asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinofílica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; gastroenteritis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o dicha composición para el tratamiento de un sujeto que necesita dicho tratamiento, o una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α .

En una realización, la enfermedad o trastorno se selecciona de entre asma, por ejemplo, asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinofílica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; gastroenteritis eosinofílica, síndrome hipereosinofílico.

Breve descripción de los dibujos

- Fig.1. Mapa plasmídico para la generación transitoria de antígenos con proteína de fusión Fc.
- Fig.2. Mapa de plásmidos para la generación transitoria de antígenos con la etiqueta C-terminal EPE (FE).
- Fig.3. Mapa de plásmidos para la generación transitoria de antígenos con etiqueta His-b.
- Fig.4. Antígenos del electroforegrama en condiciones reductoras 10% SDS-PAGE
- Fig.5. Electroforegrama de antígenos en condiciones reductoras 10% SDS-PAGE
- Fig.6. Antígenos del electroforegrama y anticuerpos en condiciones no reductoras (7.5% SDS-PAGE).
- Fig.7. Esquema de síntesis de la biblioteca humana combinatoria ingenua.
- Fig.8. Mapa de fagémidos para clonar bibliotecas de visualización de fagos Fab.
- Fig.9. Mapa de plásmidos de expresión para la producción de Fab.
- Fig. 10. Análisis de inmunoenzimas de fagos policlonales de bibliotecas de post-selección para antígenos específicos y no específicos.
- Fig. 11. Sensograma de interacción de anticuerpos con IL-5Ra en un dispositivo Octet RED 384 (BCD 133-03-002).
- Fig. 12. Sensograma de interacción de anticuerpos con IL-5Ra en un dispositivo Octet RED 384 (BCD 133-03-020).
- Fig. 13. Sensogramas de interacción de anticuerpos con IL-5Ra en un dispositivo Octet RED 384 (BCD133-03-021).
- Fig. 14. Dependencia de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de la concentración de anticuerpos.
- Fig. 15. Los valores de la concentración efectiva semimáxima (CE50) en el análisis comparativo con el anticuerpo Benralizumab.
- Fig. 16. Sensograma de interacción de anticuerpos con macaco IL-5Ra utilizando un dispositivo Octet RED 384 (BCD133-03-002).
- Fig. 17. Sensograma de interacción de anticuerpos con macaco IL-5Ra en un dispositivo Octet RED 384 (BCD133-03-020).
- Fig. 18. Sensograma de interacción de anticuerpos con macaco IL-5Ra en un dispositivo Octet RED 384 (BCD133-03-021).

Fig.19. Modelo espacial 3D del complejo BCD-133 e IL-5Ra.

Fig.20. Modelo espacial 3D del complejo BCD-133 e IL-5Ra.

Fig.21. Gráfico del tamaño medio de partícula (Z-promedio) versus temperatura.

Fig.22. Gráfico del tamaño medio de partículas (promedio Z) frente a la temperatura.

Fig. 23. Cromatogramas combinados de BCD-133 a escala reducida. Azul intacto, rojo: 72 horas de incubación a 50 ° C en acetato 20 mM, pH = 5.0. La longitud de onda es de 220 nm.

Fig. 24. Cromatogramas combinados de BCD-133 a escala ampliada. Azul intacto, rojo: 72 horas de incubación a 50 ° C en acetato 20 mM, rGH = 5.0. La longitud de onda es de 220 nm.

Descripción de la Invención

Definiciones y métodos generales

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente tendrán el mismo significado con le asigna comúnmente un experto en la técnica.

Asimismo, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular incluirán el plural y los plurales incluirán el término en singular. Típicamente, la clasificación y los métodos de cultivo celular, biología molecular, inmunología, microbiología, genética, química analítica, química de síntesis orgánica, química médica y farmacéutica, así como la hibridación y química de las proteínas y ácidos nucleicos descritos aquí son bien conocidos y ampliamente utilizados por los expertos en la técnica. Las reacciones enzimáticas y los métodos de purificación se realizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como es común en la técnica, o bien como se describe en el presente documento.

Definiciones relacionadas con los anticuerpos

El término IL-5R o "receptor de interleucina 5", como se usa en el presente documento, es una proteína que se une a la interleucina 5 (IL-5). La expresión del receptor de interleucina 5 (IL-5R) se observa principalmente solo en la superficie de los eosinófilos, basófilos y mastocitos. IL-5R consiste en una única cadena α (IL-5Ra/CD125, dominio extracelular) y se comparte con los receptores de IL-3 y GM-CSF de cadena β (bc/CD131), que en sí misma no se une a un ligando, pero aumenta la afinidad de IL-5 al receptor homónimo y está directamente involucrado en la transducción de señales.

La amplificación de este gen y/o la hiperexpresión de la proteína del mismo han sido encontrados en muchas enfermedades autoinmunes, incluidas el asma, por ejemplo, el asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, el asma eosinofílica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; gastroenteritis eosinofílica o síndrome hipereosinofílico.

El término "molécula de unión" incluye a anticuerpos e inmunoglobulinas.

El término “anticuerpo” o “immunoglobulina” (Ig) como se usa en el presente incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, “porción de unión al antígeno”) o bien cadenas simples. El término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por uniones por enlaces de disulfuro, o una porción de unión al antígeno. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada aquí como VH) y una región constante de cadena pesada. Se conocen cinco tipos de cadenas pesadas de Ig de mamíferos indicadas por las letras griegas: α , δ , ϵ , γ y μ . El tipo de una cadena pesada presente define la clase de un anticuerpo; estas cadenas se encuentran en los anticuerpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente. Las distintas cadenas pesadas difieren en tamaño y composición; α y γ contienen aproximadamente 450 aminoácidos, mientras que μ y ϵ tienen aproximadamente 550 aminoácidos. Cada cadena pesada tiene dos regiones, la región constante y la región variable. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en una línea), y una región bisagra para mayor flexibilidad (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, cc.89-99); las cadenas pesadas μ y ϵ tienen una región constante compuesta por cuatro dominios constantes CH1, CH2, CH3 y CH4. En los mamíferos, se conocen solo dos tipos de cadenas ligeras indicadas por lambda (λ) y kappa (κ). Cada cadena ligera consta de una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como VL) y una región constante de cadena ligera. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferiblemente, la cadena ligera es una cadena ligera kappa (κ), y el dominio constante CL es preferiblemente C kappa (κ).

Los “anticuerpos” de acuerdo con esta invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, preferentemente IgG), o una subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2, preferentemente IgG1).

Las regiones VL and VH pueden además subdividirse en regiones de hipervariabilidad llamadas regiones determinantes de la complementariedad (*complementarity determining regions* (CDR), intercaladas entre regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, incluidas varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo o “fragmento de unión al antígeno” (o simplemente “porción de anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo”), como se usa en

este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión que se incluyen dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmento de Fab monovalente, un fragmento que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH 1; (ii) fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH/VHH; y (vi) región determinante de complementariedad extraída (CDR). Además, dos regiones del fragmento Fv, VL y VH, están codificadas por genes separados, se pueden unir usando métodos recombinantes usando un enlazador sintético que les permite recibir una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH están emparejadas para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; " Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Se supone que tales moléculas de cadena simple también se incluyen dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo o "fragmento de unión al antígeno" (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión que se incluyen dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmento de Fab monovalente, fragmento que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH 1; (ii) fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH/VHH; y (vi) región determinante de complementariedad extraída (CDR). Además, dos regiones del fragmento Fv, VL y VH, están codificadas por genes separados, se pueden unir usando métodos recombinantes usando un enlazador sintético que les permite recibir una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH están emparejadas para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv). Ver, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; " Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-

5883). Se supone que tales moléculas de cadena simple también se incluyen dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Preferiblemente, la CDR de la porción de unión al antígeno o la porción de unión al antígeno del anticuerpo completo de la invención deriva de una biblioteca de ratones, llamas o donantes humanos, o sustancialmente de origen humano con ciertos residuos de aminoácidos alterados, por ejemplo, sustituidos con diferentes residuos de aminoácidos a fin de optimizar las propiedades de los anticuerpos específicos, por ejemplo, KD, koff, IC50, EC50, ED50. Preferiblemente, las regiones marco de los anticuerpos de la invención son de origen humano o sustancialmente de origen humano (al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% de origen humano).

En otras realizaciones, la porción de unión al antígeno de la invención se puede derivar de otras especies no humanas que incluyen ratón, llama, conejo, rata o hámster, pero no se limitan a éstas. Alternativamente, la región de unión al antígeno puede derivarse de la especie humana.

El término "dominio variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren enormemente en las secuencias, entre los anticuerpos. El dominio V media en la unión del antígeno y determina la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente en el intervalo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en fragmentos invariantes llamados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o CDR. Los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprenden cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que se conectan y, en algunos casos, forman parte de la estructura de la hoja beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en las proximidades de las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", como se usa en el presente documento, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más residuos de aminoácidos de CDR para mejorar la afinidad de unión al epítopo deseado. Esto se conoce como "maduración de

afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones en las que la humanización de un anticuerpo conduce a una especificidad o afinidad de unión reducida y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o afinidad de unión por mutaciones secundarias por sí sola. En la técnica se conocen varios métodos de maduración de afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación de barrido in vitro descrito por Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 412–417 (1997) y el método de maduración de afinidad in vitro por etapas de Wu. et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 6037 6042 (1998).

Las "regiones marco" ("*framework regions*" -FR) son aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de CDR. Cada dominio variable normalmente tiene cuatro FR identificadas como FR1, FR2, FR3 y FR4. Si las CDR se definen de acuerdo con Kabat, los residuos de la cadena ligera FR se posicionan en los residuos 1-23 (LCFR1), 35-49 (LCFR2), 57-88 (LCFR3), y 98-107 (LCFR4) y los residuos de la cadena pesada FR se posicionan aproximadamente en los residuos 1-30 (HCFR1), 36-49 (HCFR2), 66-94 (HCFR3) y 103-113 (HCFR4) en la cadena pesada. Si las CDR comprenden residuos de aminoácidos de bucles hipervariables, los residuos FR de cadena ligera se colocan en los residuos 1-25 (LCFR1), 33-49 (LCFR2), 53-90 (LCFR3) y 97-107 (LCFR4) en la cadena ligera y los residuos FR de la cadena pesada se posicionan aproximadamente en los residuos 1-25 (HCFR1), 33-52 (HCFR2), 56-95 (HCFR3) y 102-113 (HCFR4) en los residuos de la cadena pesada. En algunos casos, cuando la CDR comprende aminoácidos tanto de una CDR como la define Kabat y los de un bucle hipervariable, los residuos FR se ajustarán en consecuencia. Por ejemplo, cuando CDRH1 incluye los aminoácidos H26-H35, los residuos de la cadena pesada FR1 están en las posiciones 1-25 y los residuos de la FR2 están en las posiciones 36-49.

Un anticuerpo de la presente invención "que se une" o "se fija" a un antígeno "meta" (*target*) se refiere a un anticuerpo capaz de unirse al antígeno con una afinidad suficiente de tal manera que el anticuerpo se puede usar como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula que expresa dicho antígeno, y tiene una leve reacción cruzada con otras proteínas. De acuerdo con los métodos analíticos: clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), radioinmunoensayo (RIA) o ELISA, en tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo a una proteína no diana es inferior al 10% de la unión del anticuerpo a una proteína diana específica. Con respecto a la unión de un anticuerpo a una molécula meta, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en una proteína polipeptídica particular, significa una unión que es notoriamente (mensurablemente) diferente de una interacción no específica (por ejemplo, en el caso de bH1-44 o bH1-81, una interacción no específica es la unión a la albúmina de suero bovino, la caseína, el suero bovino fetal o la neutravidina).

La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que es similar a la de la meta, por ejemplo, un exceso de la diana no marcada. En este caso, se indica la unión específica si la unión de la diana etiquetada a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de la diana no etiquetada. Tal como se usa en el presente documento, el término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido específico puede ser descrito por una molécula que tiene una K_d para la diana de al menos aproximadamente 200 nM, o al menos aproximadamente 150 nM, o al menos aproximadamente 100 nM, o al menos aproximadamente 60 nM, o al menos aproximadamente 50 nM, o al menos aproximadamente 40 nM, o al menos aproximadamente 30 nM, o al menos aproximadamente 20 nM, o al menos aproximadamente 10 nM, o al menos aproximadamente 8 nM, o al menos aproximadamente 6 nM, o al menos aproximadamente 4 nM, o al menos aproximadamente 2 nM, o al menos aproximadamente 1 nM, o más. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin sustancialmente unirse a cualquier otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

El término " K_a ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la tasa de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término " K_d " pretende referirse a la tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión único de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca (característica, verdadera) 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 por su pareja de unión Y generalmente puede representarse por la constante de disociación (K_d). El valor de K_d preferido es aproximadamente 200 nM, 150 nM, 100 nM, 60 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 8 nM, 6 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM o menos. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica, incluidos los descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad generalmente se unen a un antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen a un antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos por más tiempo. Una variedad de métodos para medir la afinidad de unión son conocidos en la técnica, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención.

En una realización, "Kd" o "valor Kd" se mide mediante ensayos de resonancia de plasmón de superficie utilizando BIAcore™ -2000 o BIAcore™ -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips de antígenos inmovilizados CM5 en ~ 10 unidades de respuesta (RU). En breve, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) se activan con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropilo)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5 µg/ml (~ 0.2 µM) y luego se inyecta a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta 1M de una solución de etanolamina para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones dobles en serie de Fab (por ejemplo, de 0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a un caudal de aproximadamente 25 µl/min. Las tasas de activación (kon) y las tasas de desactivación (koff) se calculan utilizando un modelo de enlace Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software versión 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensor de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación koff/kon. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol. Biol. 293: 865-881. Si la velocidad de activación supera los $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón de superficie anterior, la velocidad de activación puede determinarse utilizando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25°C de una solución de anticuerpo antígeno-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7.2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno según se mide en un espectrómetro, como un espectrofómeto equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco de la serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

El término "koff" se refiere al índice constante de desconexión de una interacción particular entre una molécula de unión y un antígeno. El índice de constante de desconexión koff se puede medir utilizando la interferometría de biocapa, por ejemplo, utilizando el sistema Octet™.

El "índice de conexión" o "kon" de acuerdo con la presente invención también se puede medir usando los ensayos de resonancia de plasmones de superficie anteriores utilizando BIAcore™ -2000 o BIAcore™ -3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips de antígeno CM5 inmovilizado en ~ 10 unidades relativas (unidades de respuesta, RU). Brevemente, los chips biosensores de dextrano carboximetilados (CM5, BIAcore Inc.) se activan con N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del fabricante. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4.8, en 5 µg/ml (~ 0.2 µM) y luego se inyecta a un caudal de 5 µl/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades

de respuesta (RU) de proteína acoplada. Después de la inyección de antígeno, se inyecta una solución de etanolamina 1M para bloquear los grupos que no han reaccionado.

A menos que se especifique lo contrario, el término "biológicamente activo" y "actividad biológica" y "características biológicas" con respecto a un polipéptido de la invención significa que tiene la capacidad de unirse a una molécula biológica.

El término "molécula biológica" se refiere a un ácido nucleico, una proteína, un carbohidrato, un lípido y combinaciones de los mismos. En una realización, la molécula biológica existe en la naturaleza.

Los fragmentos de anticuerpos, como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos utilizando técnicas convencionales, como la digestión con papaína o pepsina de anticuerpos completos. Además, pueden prepararse anticuerpos, porciones de los mismos y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, como se describe en el presente documento.

El término "anticuerpo recombinante" pretende referirse a un anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos, en la que dichas secuencias de nucleótidos no están asociadas de forma natural con la célula.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo variante" pretende referirse a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo "parental" del mismo en virtud de agregar, eliminar y/o sustituir uno o más residuos de aminoácidos en comparación con la secuencia de un anticuerpo parental. En una realización preferida, un anticuerpo variante comprende al menos uno o más (por ejemplo, uno a doce, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve, diez, once o doce; en algunas realizaciones, un el anticuerpo variante comprende de una a aproximadamente diez adiciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con un anticuerpo parental. En algunas realizaciones, tales adiciones, eliminaciones y/o sustituciones se realizan en las CDR de un anticuerpo variante. La identidad u homología con respecto a la secuencia de un anticuerpo variante se define aquí como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo variante que son idénticos a los residuos del anticuerpo parental, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de la secuencia. Un anticuerpo variante conserva la capacidad de unirse al mismo antígeno, y preferiblemente a un epítopo, al que se une el anticuerpo parental; y en algunas realizaciones, al menos una propiedad o actividad biológica es superior a las de un anticuerpo parental. Por ejemplo, un anticuerpo variante puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión más fuerte, una vida media más larga, una IC₅₀ más baja o una capacidad mejorada para inhibir la actividad biológica del

antígeno en comparación con un anticuerpo parental. La variante de anticuerpo de particular interés en este documento es una que demuestra al menos 2 veces, (preferiblemente al menos 5 veces, 10 veces o 20 veces) el aumento de la actividad biológica en comparación con un anticuerpo parental.

El término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo que tiene uno o varios dominios de unión al antígeno que son capaces de unirse específicamente a dos epítomos diferentes en una única molécula biológica o capaces de unirse específicamente a epítomos en dos moléculas biológicas diferentes. El anticuerpo biespecífico también se menciona aquí como que tiene "especificidad dual" o como un anticuerpo de "especificidad dual".

En un sentido amplio, el término "anticuerpo quimérico" quiere referirse a un anticuerpo que comprende una o más regiones de un anticuerpo, y una o más regiones de uno o varios otros anticuerpos, típicamente, un anticuerpo parcialmente humano y parcialmente no humano, es decir, derivado parcialmente de un animal no humano, como ser ratones, ratas o parásitos similares, o camélidos, como la llama y alpaca. Generalmente se prefieren los anticuerpos quiméricos a los anticuerpos no humanos con el fin de reducir el riesgo de una respuesta inmunológica anti-anticuerpo humano, por ejemplo, una respuesta inmunológica al anti-anticuerpo ratón en humanos en el caso de un anticuerpo murino. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico típico es uno en el que las secuencias de la región variable son secuencias murinas, mientras que las secuencias de la región constante son humanas. En el caso de un anticuerpo quimérico, las partes no humanas pueden someterse a una alteración adicional para humanizar el anticuerpo.

El término "humanización" pretende referirse al hecho de que cuando un anticuerpo tiene un origen total o parcialmente no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón o llama obtenido mediante la inmunización de ratones o llamas, respectivamente, con un antígeno de interés, o es un anticuerpo quimérico basado en dicho anticuerpo de un ratón o una llama, es posible sustituir ciertos aminoácidos, en particular en las regiones marco y en los dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras, a fin de evitar o minimizar la respuesta inmunológica en los humanos. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se encuentran en los seis CDR de cadena pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son mucho más variables entre los anticuerpos individuales que aquellos que están fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de un anticuerpo natural específico, o más generalmente, de cualquier anticuerpo específico con dicha secuencia de aminoácidos, por ejemplo, construyendo vectores de expresión que expresan secuencias CDR del anticuerpo específico y secuencias marco de un anticuerpo diferente. Como resultado, es posible "humanizar" un anticuerpo no humano y, en gran

medida, preservar la especificidad de la unión y la afinidad del anticuerpo inicial. Aunque no es posible predecir con precisión la inmunogenicidad y, por lo tanto, la respuesta del anticuerpo humano a un anticuerpo particular, los anticuerpos no humanos son típicamente más inmunogénicos que los anticuerpos humanos. Los anticuerpos quiméricos, donde las regiones constantes extrañas (por ejemplo, parásitos o camélidos) han sido sustituidos por secuencias de origen humano, han demostrado ser generalmente menos inmunogénicos que los de origen totalmente extraño, y la tendencia de los anticuerpos terapéuticos es hacia anticuerpos humanizados o completamente humanos. Por lo tanto, los anticuerpos quiméricos u otros anticuerpos de origen no humano pueden ser humanizados para reducir el riesgo de una respuesta anti-anticuerpos humana.

Para los anticuerpos quiméricos, la humanización típicamente implica la modificación de las regiones marco de las secuencias de la región variable. Los residuos de aminoácidos que forman parte de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a menudo no se modificarán debido a la humanización, aunque en algunos casos puede ser deseable para modificar los residuos de aminoácidos individuales de una CDR, por ejemplo, a fin de suprimir un sitio de glicosilación, un sitio de deamidación, un sitio de isomerización de aspartato o residuos de cisteína o metionina no deseados. La glicosilación ligada a N se realiza mediante la unión de una cadena de oligosacáridos a un residuo de asparagina en una secuencia tripeptídica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro. La eliminación de un sitio de N-glicosilación se puede lograr mediante la mutación del residuo Asn o Ser/Thr por un residuo diferente, preferiblemente mediante una sustitución conservadora. La desamidación de los residuos de asparagina y glutamina puede ocurrir dependiendo de factores tales como el pH y la exposición a la superficie. Los residuos de asparagina son especialmente susceptibles a la desamidación, principalmente cuando están presentes en la secuencia Asn-Gly, y en menor grado en otras secuencias dipeptídicas tales como Asn-Ala. Siempre que una secuencia de CDR comprenda tal sitio de desamidación, en particular Asn-Gly, puede ser deseable eliminar este sitio, típicamente en virtud de una sustitución conservadora para eliminar uno de los residuos implicados.

En la técnica se conocen numerosos métodos para la humanización de una secuencia de anticuerpos. Un método comúnmente utilizado es el injerto de CDR. El injerto de CDR puede basarse en las definiciones de CDR de Kabat, aunque la última edición (Magdelaine-Beuzelin y otros, Crit Rev.Oncol Hematol. 64: 210-225 (2007)) sugiere que la definición del IMGT® (el sistema de información internacional ImMunoGeneTics®, www.imgt.org) puede mejorar los resultados de la humanización (ver Lefranc et al., Dev. Comp Immunol. 27: 55-77 (2003)). En algunos casos, el injerto de CDR puede reducir la especificidad y la afinidad de unión, y por lo

tanto la actividad biológica, de un anticuerpo no humano injertado en CDR, en comparación con un anticuerpo parental del cual se obtuvieron las CDR. Las mutaciones posteriores (que a veces se denominan "reparación de la región marco") se pueden introducir en posiciones seleccionadas de un anticuerpo injertado en CDR, típicamente en regiones marco, para restablecer la especificidad de unión y la afinidad de un anticuerpo parental. Se puede realizar la identificación de posiciones para posibles las mutaciones posteriores utilizando la información disponible en la literatura y en las bases de datos de anticuerpos. Los residuos de aminoácidos que son candidatos para mutaciones posteriores son típicamente aquellos que se encuentran en la superficie de una molécula del anticuerpo, mientras que los residuos que están enterrados o tienen un grado bajo normalmente no se alterarán. Está resurgiendo una técnica de humanización alternativa al injerto de CDR y de mutación inversa, en la que se conservan los residuos no expuestos a la superficie de origen no humano al tiempo que se alteran los residuos de la superficie a los residuos humanos.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos utilizando dos técnicas: utilizando bibliotecas de fagos recolectadas in vitro o mediante la inmunización in vivo de animales humanizados (ratones, ratas, etc.).

La construcción de bibliotecas combinatorias de anticuerpos de fagos comienza con la selección de una fuente de repertorio genético, según la cual se pueden distinguir varios tipos de bibliotecas de anticuerpos: naive, inmunológicas y sintéticas. Las bibliotecas naive e inmunológicas se construyen utilizando genes reorganizados naturalmente, que codifican los dominios de inmunoglobulina variables de donantes sanos o donantes inmunizados con un determinado antígeno, respectivamente. El ARNm de la línea celular linfóide productora de anticuerpos se aísla para este propósito. Se utilizan principalmente linfocitos de sangre periférica, pero también se han usado esplenocitos [Sheets MD, Amersdorfer P, Finnern R, Sargent P, Lindquist E, Schier R, et al. *Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:6157-6162 y de Haard HJ, van Neer N, Reurs A, Hufton SE, Roovers RC, Henderikx P, et al. *A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies*. J Biol Chem 1999;274:18218-18230.], células de médula ósea o linfocitos de médula ósea [Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. *Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library*. Nat Biotechnol 1996;14:309-314.]. El ADNc luego se sintetiza en la base del ARNm, y se pueden usar tanto los cebadores oligo-dT como los hexanucleótidos diseñados estadísticamente que producen copias de ADNc de todas las posibles variantes de genes que codifican los dominios variables de los anticuerpos. [Ulitin AB, Kapralova MV, Laman AG, Shepelyakovskaya AO, Bulgakova EB, Fursova KK, et al.

The library of human miniantibodies in the phage display format: Designing and testing DAN: Izd-vo "Nauka"; 2005.].

Se pueden usar simultáneamente uno o varios cebadores para limitar el rango de los genes amplificados a una o varias familias de genes de dominio variable o isotipos de anticuerpos, ahora a nivel del ADNc. [Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. *Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage*. J Mol Biol 1991,222:581-597]. Los cebadores utilizados para la amplificación de genes que codifican inmunoglobulinas son complementarios de sus regiones más conservadoras. Sus secuencias se seleccionan de colecciones de genes que se organizan en bases de datos, como las bases de datos Kabat o V BASE. El diseño del cebador también proporciona sitios de restricción interna para clonar los productos de la PCR en los vectores apropiados.

La construcción de bibliotecas sintéticas se basa en la sustitución de CDR naturales por un conjunto de secuencias aleatorias. En este caso, es posible generar una gran variedad de sitios de unión al antígeno.

La exhibición de fagos es una de las técnicas in vitro más poderosas y ampliamente utilizadas para la búsqueda de anticuerpos. En 1985, Smith descubrió que secuencias extrañas de ADN podían ser clonadas en el bacteriófago M13 filamentoso y que tal secuencia clonada puede expresarse en la superficie de las partículas del fago como proteínas de fusión (Smith GP: *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface*. Science 1985, 228:1315-1317.). Por lo tanto, es posible seleccionar las proteínas de fusión de interés en función de su capacidad para unirse a otras proteínas. Este descubrimiento se combinó con los métodos de amplificación por PCR, que hicieron posible clonar el repertorio de ADNc de los genes de inmunoglobulina para crear una variedad de bibliotecas de fagos que contienen dominios variables que se pueden usar para buscar rápidamente anticuerpos monoclonales focalizados específicamente (*target-specific*). El repertorio de la biblioteca de fagos refleja el repertorio del anticuerpo de células B de cada persona o animal cuya sangre se utilizó para crear la biblioteca. En 1995, dos artículos describieron la producción de ratones modificados genéticamente que eran capaces de expresar anticuerpos completamente humanos, cuyos repertorios son comparables a los obtenidos por la tecnología de hibridoma (Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, Trounstine M, Higgins KM, Schramm SR, Kuo CC, Mashayekh R, Wymore K, McCabe JG et al.: *Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications*. Nature 1994, 368:856-859). En estos animales, sus propios genes de la cadena de inmunoglobulina endógena pesada y ligera k fueron destruidos deliberadamente, seguido de la introducción de transgenes, que son los segmentos de los genes de la cadena ligera y pesada k humana. Resultó que el sistema inmune del ratón puede utilizar el repertorio genético humano para producir anticuerpos de alta especificidad y alta afinidad contra una mayor variedad de antígenos.

A pesar de que los ratones transgénicos expresan receptores de células B que son esencialmente híbridos de componentes humanos y de ratón (inmunoglobulina humana, Ig α de ratón, Ig β y otras moléculas de señalización), sus células B se desarrollan y maduran normalmente.

En ciertos casos, también puede ser deseable alterar uno o más residuos de aminoácidos de CDR para mejorar la afinidad de unión al epítipo meta. Esto se conoce como "maduración de afinidad" y puede realizarse opcionalmente en relación con la humanización, por ejemplo, en situaciones en las que la humanización de un anticuerpo conduce a una especificidad o afinidad de unión reducida y no es posible mejorar suficientemente la especificidad o afinidad de unión por mutaciones secundarias solamente. En la técnica se conocen varios métodos de maduración de afinidad, por ejemplo, el método de mutagénesis de saturación de barrido in vitro descrito por Burks et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94: 412–417 (1997) y el método de maduración de afinidad in vitro por etapas de Wu. et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 6037 6042 (1998).

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo que se sintetiza y se aísla mediante una población de células clónicas separadas. La población clonal puede ser una población clonal de células inmortalizadas. En algunas realizaciones, las células inmortalizadas en una población clonal son células híbridas (hibridomas), producidas típicamente por la fusión de linfocitos B individuales de animales inmunizados con células individuales de un tumor linfocítico. Los hibridomas son un tipo de células construidas y no existen en la naturaleza.

Los "anticuerpos nativos" son generalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada.

El término "aislado" utilizado para describir varios anticuerpos en esta descripción se refiere a un anticuerpo que se ha identificado y separado y/o regenerado a partir de una célula o cultivo celular, en el que se expresa el anticuerpo. Las impurezas (componentes contaminantes) de su entorno natural son materiales que podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos

del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, un anticuerpo se purifica (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria (secuenciador Edman), o (2) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando Coomassie Brilliant Blue, o preferiblemente tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido no estará presente. El polipéptido aislado se prepara típicamente mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una en la que se identifica y se separa al menos una impureza de la molécula de ácido nucleico, a la que se une la primera en la fuente natural del ácido nucleico del anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de la forma o conjunto en el que se encuentra en condiciones naturales. Por lo tanto, una molécula de ácido nucleico aislada es diferente de una molécula de ácido nucleico que existe en las células en condiciones naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico ubicada en células en las que el anticuerpo se expresa normalmente, por ejemplo, si la molécula de ácido nucleico tiene una localización cromosómica que es diferente de su localización en células en condiciones naturales

El término "epítipo", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una parte (determinante) de un antígeno que se une específicamente a una molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo o una molécula relacionada, como una molécula de unión biespecífica). Los determinantes de los epítipos generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas en la superficie, tales como aminoácidos o carbohidratos o cadenas laterales de azúcar, y típicamente comprenden características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos pueden ser "lineales" o "conformacionales". En un epítipo lineal, todos los puntos de interacción entre una proteína (por ejemplo, un antígeno) y una molécula interactiva (como un anticuerpo) ocurren linealmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína. En un epítipo conformacional, los puntos de interacción se producen a través de los residuos de aminoácidos en la proteína que se separan unos de otros en la secuencia de aminoácidos primaria. Una vez que se determina el epítipo deseado de un antígeno, es posible generar anticuerpos contra ese epítipo usando técnicas bien conocidas en la técnica. Además, la generación y caracterización de anticuerpos u otras moléculas de unión pueden dilucidar información sobre epítipos deseables. A partir de esta información, es posible, entonces, seleccionar de manera competitiva los anticuerpos para determinar su unión a epítipos iguales o

idénticos, por ejemplo, realizando estudios de competición para encontrar moléculas de unión que compitan entre sí por la unión al antígeno.

El término "enlazador de péptidos" como se usa en este documento pretende significar cualquier péptido que tenga la capacidad de combinar dominios, con una longitud que depende de los dominios a los que se une entre sí, y que comprende cualquier secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, el enlazador peptídico tiene una longitud de más de 5 aminoácidos y consiste en cualquier conjunto de aminoácidos seleccionados de entre G, A, S, P, E, T, D, K.

El término "in vitro" se refiere a una entidad biológica, un proceso biológico o una reacción biológica fuera del cuerpo en condiciones artificiales. Por ejemplo, una célula desarrollada in vitro debe entenderse como una célula desarrollada en un entorno fuera del cuerpo, por ejemplo, en un tubo de ensayo, un vial de cultivo o una placa de microtitulación.

El término "IC₅₀" (50% de concentración inhibitoria) se refiere a la concentración de fármaco e indica el volumen de inhibidor requerido para inhibir un proceso biológico en un 50%. El valor de IC₅₀ se puede calcular utilizando las curvas de dosis-respuesta apropiadas, utilizando un software estadístico especial para el ajuste de las curvas.

El término "ED50" (EC50) (50% de dosis/concentración efectiva) se refiere a la concentración del fármaco para producir un 50% de efecto biológico (que puede incluir citotoxicidad).

El término "función efectora" del anticuerpo se refiere a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (secuencia de la región Fc nativa o variantes de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo, que varía con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación hacia abajo de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B, BCR) y activación de células B.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una respuesta mediada por células efectoras inmunocompetentes (asesinos de T, asesinos naturales, etc.), en la que las células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, asesinos naturales de las células (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la lisis o fagocitosis de la célula meta. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991). Para

evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo in vitro de ADCC, como el que se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más receptores Fc y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función de efector de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA ("receptor activador") y FcγRIIB ("receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición (ITIM) inmunoreceptor tirosina en su dominio citoplásmico (ver revisión en Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92 (1991). Otros FcR, incluidos los que se identificarán en el futuro, están incluidos en el término "FcR" en este documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar una diana en presencia de un complemento. La ruta de activación del complemento se inicia mediante la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejo con un antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como el que se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

El término "identidad" u "homología" se interpreta como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que es idéntico al residuo de una secuencia correspondiente con la que se compara, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario para lograr el porcentaje máximo de identidad para toda la secuencia y no considerar las sustituciones conservativas como parte de la identidad de la secuencia. Ni las extensiones N o C-terminal ni las inserciones se interpretarán como una reducción de la identidad u homología. Los métodos y programas informáticos para la alineación son bien conocidos en la técnica. La identidad de la secuencia se puede medir utilizando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence analysis Software Package - Paquete de Software de Análisis de Secuencia, de Genetics Computer Group, del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Ave., Madison, WI 53705). Este software hace coincidir secuencias similares al asignar un grado de homología a varias sustituciones, supresiones (eliminaciones) y otras modificaciones

El término "homólogo" con respecto a una secuencia polipeptídica de un anticuerpo debe interpretarse como un anticuerpo que exhibe al menos un 70%, preferiblemente un 80%, más preferiblemente un 90% y más preferiblemente un 95% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia polipeptídica. El término en relación con una secuencia de ácido nucleico debe interpretarse como una secuencia de nucleótidos que muestra al menos el 85%, preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95% y más preferiblemente el 97% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de ácido nucleico.

Se proporcionan modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en este documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar al constructo final, siempre que el constructo final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción en el anticuerpo, como cambiar el número o la posición de los sitios de glicosilación.

Variante de modificación de secuencias de aminoácidos de anticuerpos utilizando sustituciones de aminoácidos. Dicha variante es la sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen regiones hipervariables o CDR, pero también se contemplan las alteraciones de FR o Fc. Las sustituciones conservantes se muestran en la Tabla 1 bajo el título: "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones causan una alteración de la actividad

biológica, se pueden realizar cambios sustanciales adicionales, que se denotan como "sustituciones ejemplares" expuestas en la Tabla A, o alteraciones que se describen con más detalle a continuación cuando se describen las clases de aminoácidos, y también puede realizarse la selección del producto.

Tabla 1		
Residuo Original	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones Preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gin; Asn	Lys
Asn(N)	Gin; His; Asp, Lys; Arg	Gin
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gin	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gin; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gin; 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
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Los términos "ácido nucleico", "secuencia nucleica", "secuencia de ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido", "secuencia de polinucleótido" y "secuencia de nucleótidos", usados indistintamente en la presente descripción, significan una secuencia precisa de nucleótidos, modificados o no, determinando un fragmento o una región de un ácido nucleico, que contenga

nucleótidos no naturales o no, y que sea un ADN o ARN bicatenario, un ADN o ARN monocatenario o productos de transcripción de dichos ADN.

También debería mencionarse aquí que la presente invención no se relaciona con secuencias de nucleótidos en su entorno cromosómico natural, es decir, en un estado natural. Las secuencias de la presente invención han sido aisladas y/o purificadas, es decir, se muestrearon directa o indirectamente, por ejemplo, mediante una copia, habiéndose modificado al menos parcialmente su entorno. Por lo tanto, los ácidos nucleicos aislados obtenidos por genética recombinante, por ejemplo, por medio de células huésped, u obtenidos por síntesis química, también deben mencionarse aquí.

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca a su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria de la misma con la secuencia complementaria de la misma.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para las procariotas, por ejemplo, e incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se lo coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia líder o una secuencia secretora está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia; un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si está posicionado para facilitar la traslación. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos.

El término "vector" como se usa en este documento significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se le ha enlazado. En algunas realizaciones, un vector es un plásmido, es decir, una pieza circular de ADN de doble cadena en la que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. En algunas realizaciones, un vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. En algunas realizaciones, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un sitio de replicación de origen bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). En realizaciones adicionales, los vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula

huésped tras la introducción en una célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el gen huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están vinculados operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. La presente invención se refiere a células huésped, que puede incluir, por ejemplo, un vector de acuerdo con la invención descrita anteriormente. La presente invención también se refiere a células huésped que comprenden, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que codifica una cadena pesada o porciones de unión al antígeno de las mismas, una secuencia de nucleótidos que codifica cadena ligera o porciones de unión al antígeno de la primera, o ambas, del primer dominio de unión y/o segundo dominio de unión de una molécula de unión de la invención. Debe entenderse que "célula huésped recombinante" y "célula huésped" pretenden referirse no solo a una célula sujeto en particular, sino también a la progenie de dicha célula. Dado que pueden ocurrir modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a una célula parental, sin embargo, dichas células aún están incluidas dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento.

El término "excipiente" se usa en el presente para describir cualquier ingrediente fuera del compuesto o los compuestos de la invención.

"Composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende un anticuerpo de la presente invención y al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que comprende rellenos, solventes, diluyentes, portadores, agentes auxiliares y distribuidores y sensores farmacéuticamente aceptables y compatibles, tales como conservantes, estabilizantes, rellenos, desintegradores, humectantes, emulsionantes, agentes suspensores, espesantes, edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes aromatizantes, agentes antibacterianos, fungicidas, lubricantes y controladores de administración prolongada, la elección y las proporciones adecuadas de los cuales dependerán del tipo y modo de administración y dosificación. Ejemplos de agentes de suspensión adecuados son alcohol isoestearílico etoxilado, polioxietileno, sorbitol y éter de sorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacante y sus mezclas también. La protección contra la acción de los microorganismos puede ser proporcionada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, ácido sórbico y compuestos similares. La composición también puede contener agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, polioles, cloruro de sodio y similares. La acción prolongada de la composición se puede lograr mediante agentes que disminuyen la absorción del ingrediente activo, por ejemplo, monoestearato de aluminio y

gelatina. Ejemplos de vehículos, disolventes, diluyentes y agentes de administración adecuados incluyen agua, etanol, polialcoholes y sus mezclas, aceites naturales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos (tales como oleato de etilo) para inyecciones. Ejemplos de rellenos son lactosa, leche, azúcar, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio y similares. Ejemplos de desintegradores y distribuidores son almidón, ácido algínico y sus sales, silicatos. Ejemplos de lubricantes adecuados son estearato de magnesio, laurilsulfato de sodio, talco y polietilenglicol de alto peso molecular. La composición farmacéutica para la administración peroral, sublingual, transdérmica, intraocular, intramuscular, intravenosa, subcutánea, local o rectal de ingrediente activo, sola o en combinación con otro compuesto activo puede administrarse a humanos y animales en una forma de administración estándar, en una mezcla con vehículos farmacéuticos tradicionales. Las formas de administración estándar adecuadas incluyen formas perorales tales como comprimidos, cápsulas de gelatina, píldoras, polvos, gránulos, gomas de mascar y soluciones o suspensiones perorales; formas de administración sublingual y transbucal; aerosoles; implantes. Formas locales, transdérmicas, subcutáneas, intramusculares, intravenosas, intranasales o intraoculares y formas de administración rectal.

“Medicamento” es un compuesto (o una mezcla de compuestos como una composición farmacéutica) en forma de tabletas, cápsulas, soluciones, ungüentos y otras formas listas, para la restauración, mejora o modificación de las funciones fisiológicas en humanos y animales, y para el tratamiento y la profilaxis de enfermedades, para diagnóstico, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros.

El término "enfermedad o trastorno mediado por la interacción entre la IL-5 y el receptor celular de la misma" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que esté directa o indirectamente asociado con la IL-5 y la IL-5R, incluida la etiología, el desarrollo, la progresión, la persistencia o patología de una enfermedad o trastorno. "Tratar" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o anular un trastorno biológico y/o al menos uno de los síntomas asociados con el mismo. Como se usa en este documento, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de una enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en el presente documento a un "tratamiento" incluyen referencias a un tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

En un aspecto, el sujeto sometido al tratamiento, o el paciente, es un mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser masculino o femenino, de cualquier edad.

El término "trastorno" significa cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el compuesto de la presente invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los trastornos preferidos para ser tratado aquí son las enfermedades autoinmunes.

Los términos "respuesta inmunológica", "respuesta autoinmunitaria" e "inflamación autoinmune" se refieren, por ejemplo, a la acción de linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por dichas células o células hepáticas (incluidos los anticuerpos, citoquinas y complemento producidos como resultado del daño selectivo, destrucción o eliminación de patógenos invasivos, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos normales del cuerpo humano).

El término "enfermedad autoinmune" como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad o trastorno no maligno que surge de los (auto) antígenos y/o tejidos de un individuo y está dirigido contra los mismos.

El término abarca, pero no se limita a, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis crónica juvenil, artritis séptica, osteoartritis de Lyme, artritis psoriásica, artritis reactiva, espondiloartropatía, lupus sistémico, eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes mellitus, tiroiditis, asma, enfermedades alérgicas, psoriasis, dermatitis atópica, esclerodermia, reacción de "injerto contra huésped" (EICH), rechazo de trasplantes de órganos, enfermedades inmunes agudas o crónicas asociadas con el trasplante de órganos, sarcoidosis, enfermedad de Kawasaki, enfermedad de Graves, síndrome nefrótico, síndrome de fatiga crónica, Granulomatosis de Wegener, púrpura de Schönlein-Henoch, vasculitis renal microscópica, hepatitis crónica activa, uvenita, shock séptico, síndrome de shock tóxico, sepsis, caquexia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, mielitis transversa aguda, corea de Huntington, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, cirrosis biliar primaria, anemia hemolítica, síndrome de dificultad respiratoria en adultos (aguda), alopecia, alopecia areata, artropatía seronegativa, artropatía, enfermedad de Reiter, artropatía psoriásica asociada a artropatía por colitis ulcerosa, alergia atópica, enfermedad bipolar autoinmunitaria, pénfigo vulgar, pénfigo pсевigador, anemia hemolítica, anemia hemolítica positiva de Coombs, anemia perniciosa, anemia perniciosa juvenil, artritis, hepatitis A esclerosante primaria, hepatitis autoinmune criptogénica, enfermedad pulmonar fibrosis, alveolitis fibrosis criptogénica, enfermedad pulmonar intersticial postinflamatoria, neumonitis intersticial, neumonitis intersticial, neumonía eosinofílica crónica, enfermedad pulmonar intersticial infecciosa, artritis gotosa, hepatitis autoinmune, hepatitis autoinmune tipo I (hepatitis autoinmune clásica o lupoid), hepatitis autoinmune tipo II, osteoartritis, colangitis esclerosante primaria, psoriasis tipo I, psoriasis tipo II, leucopenia idiopática, neutropenia autoinmune, enfermedad renal de NOS, glomerul onfritis, vasculitis renal microscópica, lupus eritematoso discoide, infertilidad idiopática o NOS masculina, autoinmunidad al esperma, esclerosis múltiple (todos los subtipos), oftalmía simpática, hipertensión pulmonar, hipertensión pulmonar secundaria a tejido conectivo, síndrome de Goodpasture, síndrome

pulmonar, manifestaciones pulmonares de poliartritis nodosa, fiebre reumática aguda, espondilitis reumatoidea, espondilitis anquilosante, enfermedad de Still, esclerosis sistémica, Síndrome de Sjögren, enfermedad de Takayasu/artritis, trombocitopenia autoinmune, trombocitopenia idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, hipertiroidismo, hipotiroidismo autoinmune del bocio (enfermedad de Hashimoto), hipertiroidismo, hipotiroidismo, injerto autoinmunitario, hipotiroidismo uveítis, vasculitis primaria, vitiligo, enfermedad hepática aguda, enfermedad crónica del hígado, alergias, asma, trastornos psiquiátricos (incluyendo depresión y esquizofrenia), enfermedades mediadas de tipo Th2/enfermedades mediadas de tipo Th1, conjuntivitis, dermatitis de contacto alérgica, rinitis alérgica, deficiencia de alfa 1-antitrypsin, esclerosis lateral amiotrófica, anemia, fibrosis quística, trastornos asociados con la terapia con citoquinas, enfermedad desmielinizante, dermatitis, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, lesión por isquemia-reperusión, accidente cerebrovascular isquémico, artritis reumatoide juvenil, enteropatía autoinmune, hipoacusia autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, miocarditis autoinmune, insuficiencia ovárica autoinmune prematura y estenosis. El anticuerpo también puede tratar cualquier combinación de los trastornos anteriores.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente terapéutico que se administra, que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas del trastorno que se está tratando.

El término "uso crónico" se refiere al uso continuado (ininterrumpido) de agente (s) en oposición a la vía de administración aguda (a corto plazo) para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un largo período de tiempo.

El uso "intermitente" se refiere al tratamiento que no se realiza de manera consistente sin interrupciones, sino que es de naturaleza bastante periódica.

Tal como se usa en el presente documento, las palabras "comprenden", "tienen", "incluyen" o variaciones tales como "comprende", "tienen", "incluye" o "incluidas", y todas las variaciones gramaticales se entenderán que esas formas implican la inclusión de un entero o grupo de enteros establecido, pero no la exclusión de ningún otro entero o grupo de enteros.

Descripción detallada del invento

Anticuerpo

La presente invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen específicamente a IL-5R α .

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85% o 92% homóloga o idéntica a la secuencia

DYATNYGVPYFGS (SEQ ID NO: 3), es decir, CDR3 es la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEQ ID NO: 3) o la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEC ID NO: 3) con 1 o 2 sustituciones, y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 83% o 91% homóloga o idéntica a la secuencia QSYDSSLSGHVV (SEQ ID NO: 8), es decir, CDR3 es la secuencia QSYDSSLSGHVV (SEQ ID NO: 8) o la secuencia QSYDSSLSGHVV (SEC ID NO: 8) con 1 o 2 sustituciones.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYATNYGVPYFGS (SEQ ID NO: 3).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QSYDSSLSGHVV (SEQ ID NO: 8).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYATNYGVPYFGS (SEC ID NO: 3), y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QSYDSSLSGHVV (SEQ ID NO: 8).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga o idéntica a la secuencia NYAMS (SEQ ID NO: 1), es decir, CDR1 es la secuencia NYAMS (SEQ ID NO: 1) o la secuencia NYAMS (SEQ ID NO: 1) con 1 sustitución;

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 88% o 94% homóloga o idéntica a la secuencia AINSGGKSTNYADSVKG (SEC ID NO: 2), es decir, CDR2 es la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEC ID NO: 2) o la secuencia AINSGGKSTNYADSVKG (SEC ID NO: 2) con 1 o 2 sustituciones;

(iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85% o 92% homóloga o idéntica a la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEQ ID NO: 3), es decir, CDR3 es la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEQ ID NO: 3) o la secuencia DYATNYGVPYFGS (SEC ID NO: 3) con 1 o 2 sustituciones;

y/o

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

(i) CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85% o 92% homóloga o idéntica a la secuencia SGSRSNIGSGYDVH (SEQ ID NO: 6), es decir, CDR1 es la secuencia SGSRSNIGSGYDVHH (SEQ ID NO: 6) o la secuencia SGSRSNIGSGYDVH (SEC ID NO: 6) con 1 o 2 sustituciones;

(ii) CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% u 85% homóloga o idéntica a la secuencia DDNNRPS (SEQ ID NO: 7), es decir, CDR2 es la secuencia DDNNRPS (SEQ ID NO: 7) o la secuencia DDNNRPS (SEC ID NO: 7) con 1 sustitución;

(iii) CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 83% o 91% homóloga o idéntica a la secuencia QSYDSSLSGHV (SEC ID NO: 8), es decir, CDR3 es la secuencia QSYDSSLSGHV (SEC ID NO: 8) o la secuencia QSYDSSLSGHV (SEC ID NO: 8) con 1 o 2 sustituciones.

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:

(i) CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos NYAMS (SEC ID NO: 1),

(ii) CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos AINSGGKSTNYADSVKG (SEC ID NO: 2),

(iii) CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos DYATNYGVPYFGS (SEC ID NO: 3), y/o

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

(i) CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos SGSRSNIGSGYDVH (SEC ID NO: 6),

(ii) CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos DDNNRPS (SEC ID NO: 7),

(iii) CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos QSYDSSLSGHV (SEC ID NO: 8).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o un fragmento de unión a un antígeno del mismo, que se une específicamente un IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo:

QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 4) o

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 5), y/o

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada de entre el grupo:

QAGLTQPPSVSAAPGQRTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 9) o
QSVLTQPPSVSAAPGQRTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 10).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo:

QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
TVTVSS (SEQ ID NO: 4) o
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSS (SEQ ID NO: 5), y/o

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo:

QAGLTQPPSVSAAPGQRTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 9) or
QSVLTQPPSVSAAPGQRTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFGGGTKLTVL (SEQ ID
NO: 10).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo:

QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
AVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKCDKTHHTCPPCPA

PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11) o
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12),

y/o

(b) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homóloga o idéntica a la secuencia
QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGHVVFGGGKLTVLRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13) or
QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGHVVFGGGKLTVLRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14).

En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende:

(a) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo:
QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11) o
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT

MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 12),

y/o

(b) Una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos.
QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGKLTVLRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 13) or
QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGKLTVLRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 14).

En una realización, el anticuerpo aislado, que se une específicamente a IL-5R α , es un anticuerpo monoclonal:

En una realización, el anticuerpo monoclonal, que se une específicamente a IL-5R α , es un anticuerpo IgG de longitud completa:

En una realización, el anticuerpo IgG de longitud completa, que se une específicamente a IL-5R α , es de isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En una realización, el anticuerpo IgG de longitud completa, que se une específicamente a IL-5R α , es de isotipo IgG1 humano.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-002, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende un fragmento variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYATNYGVPYFGSWGQGT
TVTVSS y un fragmento variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGKLTVL.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-020, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende un fragmento variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST

NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSS y un fragmento variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGGTKLTVL.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-021, que se une específicamente a IL-5R α y comprende un fragmento variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSS y un fragmento variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGGTKLTVL.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-002, que se une específicamente a IL-5R α y comprende un fragmento variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos
QVTLKESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYATNYGVPYFGSWGQGT
TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK y un fragmento variable de
cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos
QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGHVVFSGGGTKLTVLRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-020, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADYATNYGVPYFGSWGQGT
MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK y una cadena ligera que
 comprende la secuencia de aminoácidos
 QAGLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRSNIGSGYDVHWYQQVPGTAPKLLIFDDNNRPSG
 VPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGHVVFGGGKLTVLRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

En una realización, el anticuerpo aislado es el anticuerpo BCD133-03-021, que se une específicamente a IL-5R α , y comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSAINSGGKST
 NYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCADIATNYGVPYFGSWGQGT
 MVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
 PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP
 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
 VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK y una cadena ligera que
 comprende la secuencia de aminoácidos
 QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGSRSNIGSGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDDNNRPSGV
 PDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLGHVVFGGGKLTVLRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Moléculas de ácido nucleico

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico, en particular a secuencias que codifican anticuerpos contra IL-5R α (cadena α del receptor de interleucina 5) de la presente invención, o cualquiera de sus fragmentos, y sus diversas combinaciones, que se describen en el presente documento, opcionalmente incluyendo cualquier secuencia de enlace peptídico, que están conectadas con el mismo.

Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca también su complemento, a menos que se especifique lo contrario. Por lo tanto, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular debe entenderse como una que abarca la cadena complementaria de la misma con su secuencia complementaria. El término "polinucleótido" como se usa en el presente

documento significa una forma polimérica de nucleótidos que tienen al menos 10 bases de longitud, o ribonucleótidos, o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas simples y de doble cadena.

La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% homóloga o idéntica a una o más de dichas secuencias de nucleótidos o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-3, 6-8. En ciertas realizaciones, las secuencias de nucleótidos son al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, or 99% homólogas o idénticas a una secuencia nucleótica que codifica la secuencia de aminoácido de las SEC. ID NOs: 4-5, 9-10. La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, or 99% idénticas a una o más de dichas secuencias nucleóticas o a una secuencia nucleótida que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en las SEC. ID NOs: 11-14.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NOs: 1-14. Una molécula de ácido nucleico también puede comprender cualquier combinación de dichas secuencias de nucleótidos. En una realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 3. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 8. En una realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 1-3. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 6-8. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 4 or 5. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 9 or 10. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 4 or 5, y secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NOs: 9 or 10. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 11 or 12. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 13 or 14. En otra realización, una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NOs: 11 or 12, y secuencias de nucleótidos que codifican SEQ ID NOs: 13 or 14.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada

del

grupo:

CAAGTAACCCTAAAGGAAAGTGGAGGAGGACTTGTCCAACCCGGCGGCAGTTTAAG
ACTTAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACTTTTAGCAACTATGCTATGTTCGTGGGTGCGT
CAAGCGCCAGGAAAGGGCCTAGAATGGGTGAGCGCTATCAATAGCGGCGGAAAAA
GCACTAACTACGCGGACAGCGTGAAAGGCCGCTTCACTATAAGTCGGGACAATGCT
AAAAACACACTGTACCTCCAGATGAACTCCCTAAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTA
CTACTGCGCTGATTATGCGACTAACTATGGAGTGCCATACTTCGGAAGCTGGGGCCA
GGGAACGACCGTAACTGTGAGTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGC
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
A (SEQ ID NO: 15) o

CAAGTACAACCTACAGGAAAGTGGAGGAGGACTTGTCCAACCCGGCGGCAGTT
TAAGACTTAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACTTTTAGCAACTATGCTATGTTCGTGGGT
GCGTCAAGCGCCAGGAAAGGGCCTAGAATGGGTGAGCGCTATCAATAGCGGCGGA
AAAAGCACTAACTACGCGGACAGCGTGAAAGGCCGCTTCACTATAAGTCGGGACAA
TGCTAAAAACACACTGTACCTCCAGATGAACTCCCTAAGAGCTGAGGACACGGCTG
TGTAATACTGCGCTGATTATGCGACTAACTATGGAGTGCCATACTTCGGAAGCTGGG
GCCAGGGAACGATGGTAACTGTGAGTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC

CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAAGCCTCTCCCTGTCCCCGG
GTAAA (SEQ ID NO: 16).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena pesada y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo: CAAGTAACCCTAAAGGAAAGTGGAGGAGGACTTGTCCAACCCGGCGGCAGTTTAAG
ACTTAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACTTTTAGCAACTATGCTATGTCGTGGGTGCGT
CAAGCGCCAGGAAAGGGCCTAGAATGGGTGAGCGCTATCAATAGCGGCGGAAAAA
GCACTAACTACGCGGACAGCGTGAAAGGCCGCTTCACTATAAGTCGGGACAATGCT
AAAAACACACTGTACCTCCAGATGAACTCCCTAAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTA
CTACTGCGCTGATTATGCGACTAACTATGGAGTGCCATACTTCGGAAGCTGGGGCCA
GGGAACGACCGTAACTGTGAGTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT
GGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAAT
CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA
AACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC
ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAA
CAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG

CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCT
ACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGC
TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAA
A (SEQ ID NO: 15) o

CAAGTACAACCTACAGGAAAGTGGAGGAGGACTTGTCCAACCCGGCGGCAGTT
TAAGACTTAGCTGTGCTGCTTCTGGCTTTACTTTTAGCAACTATGCTATGTCGTGGGT
GCGTCAAGCGCCAGGAAAGGGCCTAGAATGGGTGAGCGCTATCAATAGCGGCGGA
AAAAGCACTAACTACGCGGACAGCGTGAAAGGCCGCTTCACTATAAGTCGGGACAA
TGCTAAAAACACACTGTACCTCCAGATGAACTCCCTAAGAGCTGAGGACACGGCTG
TGTACTACTGCGCTGATTATGCGACTAACTATGGAGTGCCATACTTCGGAAGCTGGG
GCCAGGGAACGATGGTAACTGTGAGTAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC
CCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT
GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTG
ACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA
GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG
GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG
TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC
CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAG
CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAAAGCCTCTCCCTGTCCCCGG
GTAAA (SEQ ID NO: 16).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera y comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homóloga o idéntica a una secuencia seleccionada del grupo:

CAGGCTGGACTGACGCAACCGCCATCTGTGAGTGCGGCTCCAGGACAACGGGTGAC
TATAAGCTGCAGCGGAAGCAGAAGCAACATAGGCAGTGGATACGACGTACATTGGT
ACCAACAAGTACCGGGGACGGCTCCGAACTACTGATATTTGACGATAATAATAGA
CCGAGCGGCGTACCAGACCGTTTTAGCGGAAGCAAAAGTGGAACGAGTGCCTCTTT
AGCCATAACTGGCCTGCAAGCTGAAGATGAAGCTGATTATTACTGTCAGAGCTACG
ACAGCAGTCTGAGTGGACACGTAGTGTTTGGAGGAGGAACGAAGCTGACGGTATTA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 17) o

CAGAGTGTGCTGACGCAACCGCCATCTGTGAGTGCGGCTCCAGGACAACGGGTGAC
TATAAGCTGCAGCGGAAGCAGAAGCAACATAGGCAGTGGATACGACGTACATTGGT
ACCAACAAGTACCGGGGACGGCTCCGAACTACTGATATACGACGATAATAATAGA
CCGAGCGGCGTACCAGACCGTTTTAGCGGAAGCAAAAGTGGAACGAGTGCCTCTTT
AGCCATAACTGGCCTGCAAGCTGAAGATGAAGCTGATTATTACTGTCAGAGCTACG
ACAGCAGTCTGAGTGGACACGTAGTGTTTGGAGGAGGAACGAAGCTGACGGTATTA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 18).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena ligera y comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo:

CAGGCTGGACTGACGCAACCGCCATCTGTGAGTGCGGCTCCAGGACAACGGGTGAC
TATAAGCTGCAGCGGAAGCAGAAGCAACATAGGCAGTGGATACGACGTACATTGGT
ACCAACAAGTACCGGGGACGGCTCCGAACTACTGATATTTGACGATAATAATAGA
CCGAGCGGCGTACCAGACCGTTTTAGCGGAAGCAAAAGTGGAACGAGTGCCTCTTT
AGCCATAACTGGCCTGCAAGCTGAAGATGAAGCTGATTATTACTGTCAGAGCTACG
ACAGCAGTCTGAGTGGACACGTAGTGTTTGGAGGAGGAACGAAGCTGACGGTATTA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA

GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 17) o
CAGAGTGTGCTGACGCAACCGCCATCTGTGAGTGCGGCTCCAGGACAACGGGTGAC
TATAAGCTGCAGCGGAAGCAGAAGCAACATAGGCAGTGGATACGACGTACATTGGT
ACCAACAACCTACCGGGGACGGCTCCGAACTACTGATATACGACGATAATAATAGA
CCGAGCGGCGTACCAGACCGTTTTAGCGGAAGCAAAAGTGGAACGAGTGCCTCTTT
AGCCATAACTGGCCTGCAAGCTGAAGATGAAGCTGATTATTACTGTCAGAGCTACG
ACAGCAGTCTGAGTGGACACGTAGTGTTTGGAGGAGGAACGAAGCTGACGGTATTA
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAA
TCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA
GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTAC
AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT (SEQ ID NO: 18).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende cualquier combinación de las secuencias de ácido nucleico anteriores.

En cualquiera de las realizaciones anteriores, pueden aislarse moléculas de ácido nucleico.

Una molécula de ácido nucleico de la invención puede aislarse de cualquier fuente que produzca un anticuerpo anti-IL-5R α o una porción del mismo. En ciertas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención se puede sintetizar, en lugar de aislarse.

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VH del primer o segundo dominio de un anticuerpo de la invención, unida en el marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena pesada de cualquier fuente. De manera similar, una molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio VL de la primera o segunda región de un anticuerpo de la invención, unida en el marco a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante de cadena ligera de cualquier fuente.

En un aspecto adicional de la invención, las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio variable de cadenas pesadas (VH) y/o ligeras (VL) de un primer o segundo dominio de unión pueden "convertirse" a lo largo de la longitud de los genes de anticuerpos. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH o VL se convierten en genes de anticuerpos en toda la longitud en virtud de la inserción en un vector de expresión que ya codifica los dominios de la cadena pesada (CH) o de la cadena ligera (CL), respectivamente, de

manera que El segmento VH está vinculado operativamente al (los) segmento (s) CH dentro del vector, y/o el segmento VL está vinculado operativamente al segmento CL dentro del vector. En otra realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican los dominios VH y/o VL se convierten en genes de anticuerpos en toda la extensión mediante el enlace, por ejemplo, enlazando una molécula de ácido nucleico que condifica los dominios VH y/o VL a una molécula de ácido nucleico que codifica dominios CH y/o CL usando técnicas de biología molecular estándar. Las moléculas de ácido nucleico que condifican cadenzas pesadas y/o ligeras a través de la longitud pueden luego ser expresadas desde una célula en la que han sido introducidas.

Las moléculas de ácido nucleico pueden ser usadas para extresar grandes cantidades de anticuerpos anti-IL-5R α recombinantes. Las moléculas de ácido nucleico también pueden ser usadas para producir anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos de cadena simple, inmunoadhesinas, diacuerpos, anticuerpos mutados y derivados de anticuerpos, como se describe en el presente documento.

Vector

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector adecuado para la expresión de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento.

La presente invención se refiere a vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican cualquiera de las secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-IL-5R α o porciones de los mismos (por ejemplo, secuencias de cadena pesada y/o ligera de un primer dominio de unión y/o pesada y/o secuencias de cadena ligera de un segundo dominio de unión), como se describe en el presente documento. La invención proporciona además vectores que comprenden moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión, anticuerpos modificados, fragmentos de anticuerpos.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico y los vectores pueden usarse para producir anticuerpos anti-IL-5R α mutados. Los anticuerpos pueden ser mutados en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o ligeras de un primer dominio de unión y/o las cadenas pesadas y/o ligeras de un segundo dominio de unión, por ejemplo, para alterar una propiedad de unión de los anticuerpos anti-IL-5R α . Por ejemplo, se puede hacer una mutación en una o más CDR para aumentar o disminuir la KD de los anticuerpos, para aumentar o disminuir la Koff, o para alterar la especificidad de unión de un anticuerpo con respecto a IL-5R α . En otra realización, se realizan una o más mutaciones en un residuo de aminoácido en el primer o segundo dominio de unión del anticuerpo anti-IL-5R α de la invención. Dichas mutaciones pueden realizarse en la CDR o en la región marco de un dominio variable, o en un dominio constante. En una realización preferida, las mutaciones se realizan en un dominio variable. En otra realización, se realizan una o más

mutaciones en un residuo de aminoácido que se sabe que ha cambiado en comparación con la línea germinal en la CDR o región estructural de un dominio variable de un anticuerpo de la invención.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-IL-5R α de la invención se expresan insertando un ADN que codifica parcial o totalmente la secuencia de un primer o segundo dominio de unión (por ejemplo, secuencias de cadenas ligeras y pesadas donde un dominio de unión comprende secuencias de cadenas ligeras y pesadas), obtenidas como se describió anteriormente, en vectores de expresión de tal manera que los genes se unen operativamente a las secuencias de control de expresión necesarias, tales como las secuencias de control de transcripción y traducción. Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus de plantas, tales como virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco, cósmidos, YAC, episomas derivados del EBV y similares. Las moléculas de ADN pueden ligarse en un vector de modo que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector cumplan su función pretendida de regular la transcripción y traducción del ADN. Se puede elegir un vector de expresión y secuencias de control de la expresión para que sean compatibles con la expresión de la célula huésped utilizada. Las moléculas de ADN que codifican parcial o totalmente las secuencias del primer y segundo dominios de unión (por ejemplo, las secuencias de cadena pesada y ligera en las que un dominio de unión comprende una secuencia de cadena pesada y ligera) pueden introducirse en vectores individuales. En una realización, cualquier combinación de dichas moléculas de ADN se introduce en el mismo vector de expresión. Las moléculas de ADN pueden introducirse en un vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementarios en un fragmento de gen y vector de anticuerpo, o ligadura de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes).

Un vector adecuado es uno que codifica secuencias de inmunoglobulina CH o CL humana funcionalmente completas, con la ingeniería apropiada del sitio de restricción, de modo que cualquier secuencia VH o VL pueda insertarse y expresarse fácilmente, como se describió anteriormente. Los genes que codifican HC y LC en dichos vectores pueden contener secuencias de intrones que dan como resultado un aumento de los rendimientos proteicos globales de los anticuerpos al estabilizar el ARNm correspondiente. Las secuencias de intrones están flanqueadas por sitios de empalme de donante y empalme de receptor, que determinan dónde se producirá el empalme de ARN. La ubicación de las secuencias de intrones puede ser en regiones variables o constantes de cadenas de anticuerpos, o tanto en regiones variables como constantes cuando se usan múltiples intrones. La poliadenilación y la terminación de la transcripción pueden ocurrir en un sitio cromosómico nativo aguas abajo de las regiones codificantes. Un vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de una cadena de anticuerpo de una célula huésped. Un gen de cadena de anticuerpo puede ser clonado en un vector de tal manera que el péptido señal se vincule en el marco al extremo amino de una cadena de

inmunoglobulina. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpos, la expresión del vector recombinante de la invención puede llevar secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpos en una célula huésped. Los expertos en la materia entenderán que el diseño de un vector de expresión, que incluye la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de una célula huésped que se va a transformar, el nivel de expresión de una proteína deseada, etcétera. Las secuencias de control preferidas para una célula huésped de expresión en mamíferos incluyen elementos virales que aseguran altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, como promotores y/o potenciadores derivados de una LTR retroviral, citomegalovirus (CMV) (como un promotor/potenciador de CMV), virus de simio 40 (SV40) (como un promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por ejemplo, el principal promotor adenovirus tardío (AdMLP)), poliomavirus y promotores de mamíferos fuertes, como el promotor de inmunoglobulina nativo o el promotor de actina. Para una descripción más detallada de los elementos de control viral y las secuencias de los mismos, consulte, por ejemplo, las patentes de EE. UU. Nos. 5.168.062, 4.510.245 y 4.968.615. Los métodos para expresar moléculas de unión, tales como anticuerpos en plantas, que incluyen una descripción de promotores y vectores, así como la transformación de plantas, son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.517.529. Los métodos para expresar polipéptidos en células bacterianas o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura, también son bien conocidos en la técnica.

Además de los genes de la cadena de anticuerpos y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, como secuencias que regulan la replicación de un vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido un vector (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a agentes medicinales, como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido un vector. Por ejemplo, los genes marcadores seleccionables incluyen un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr durante la selección/amplificación de metotrexato), un gen neo (para la selección de G418) y un gen de glutamato sintetasa.

El término "secuencia de control de la expresión", como se usa en el presente documento, pretende referirse a las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificantes a las que están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de iniciación, terminación, promotor y potenciador de la transcripción; señales de procesamiento de ARN eficientes, tales como señales de empalme

y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de las proteínas; y cuando se desee, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo huésped; en las procariotas, tales secuencias de control generalmente incluyen el promotor del sitio de unión al ribosoma y las secuencias de terminación de la transcripción; en las eucariotas, típicamente, tales secuencias de control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir al menos todos los componentes, cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales, cuya presencia es conveniente, por ejemplo, las secuencias líder y las secuencias de parejas de fusión.

Células huésped

Un aspecto más de la invención se refiere a métodos para producir anticuerpos anti-IL-5R α de la invención. Una realización de la invención se refiere a un método para producir anticuerpos como se define en el presente documento, que comprende introducir/preparar una célula huésped recombinante capaz de expresar anticuerpos, cultivar dichas células huésped en condiciones adecuadas para la expresión/producción de los anticuerpos, y aislar el anticuerpo obtenido. Los anticuerpos anti-IL-5R α producidos por dicha expresión en tales células huésped recombinantes se denominan en el presente documento "anticuerpos anti-IL-5R α recombinantes". La invención también se refiere a la progenie de células de tales células huésped y a los anticuerpos anti-IL-5R α obtenidos de manera análoga.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anti-IL-5R α de la invención y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico pueden usarse para la transfección de un mamífero adecuado o célula del mismo, planta o célula del mismo, célula huésped bacteriana o de levadura. La transformación puede ser mediante cualquier técnica conocida para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada con dextrano, transfección de complejo de ácido nucleico-polímero catiónico, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada con polibreno, fusión de protoplastos, encapsulación del polinucleótido (s) Liposomas, y microinyección directa de ADN en núcleos. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse en células de mamíferos mediante vectores virales. Los métodos para transfectar células son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nos. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455. Los métodos para transformar células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa,

electroporación y transformación viral. Los métodos para transformar células bacterianas y de levadura también son bien conocidos en la técnica.

Las líneas celulares de mamífero usadas como huéspedes para la transformación son bien conocidas en la técnica e incluyen una pluralidad de líneas celulares inmortalizadas disponibles. Estas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células NS0, células SP2, células HEK-293T, células FreeStyle 293 (Invitrogen), células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster (BHK), células renales de mono verde africano(COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549 y varias otras líneas celulares. Las líneas celulares se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y proporcionan las características necesarias de la proteína producida. Otras líneas celulares que se pueden usar son líneas celulares de insectos, como las células Sf9 o Sf21. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican anticuerpos anti-IL-5R en células huésped de mamíferos, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión de los anticuerpos en las células huésped o, más preferiblemente, la secreción de los anticuerpos en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos anti-IL-5R α pueden reconstituirse a partir del medio de cultivo utilizando técnicas estándar de purificación de proteínas. Las células huésped de vegetales incluyen, por ejemplo, Nicotiana, Arabidopsis, espirodela, maíz, trigo, papa, etc. Las células huésped bacterianas incluyen especies de Escherichia y Streptomyces. Las células huésped de levadura incluyen Schizosaccharomyces pombe, Saccharomyces cerevisiae y Pichia pastoris.

Además, el nivel de producción de anticuerpos anti-IL-5R α de la invención a partir de líneas celulares de producción puede mejorarse usando varias técnicas conocidas. Por ejemplo, el sistema de expresión génica de la glutamina sintetasa (el sistema GS) es un enfoque común para mejorar la expresión en ciertas condiciones. El sistema GS se discute en su totalidad o en parte en relación con los números 0216846, 0256055, 0323997 y 0338841 de EP.

Es probable que los anticuerpos anti-IL-5R α expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan un perfil de glicosilación diferente en comparación con otros. Sin embargo, todos los anticuerpos anti-IL-5R α codificados por las moléculas de ácido nucleico descritos aquí, o que comprenden las secuencias de aminoácidos proporcionadas en este documento son parte de la presente invención, independientemente de la glicosilación de las moléculas de unión y, en general, independientemente de la presencia o ausencia de modificaciones post-traducción.

Preparación de los anticuerpos

La invención también se refiere a los métodos y procesos para producir los anticuerpos anti-IL-5R α y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler, et al. Nature 256,1975, p. 495, o puede prepararse utilizando métodos de ADN recombinante (US 4816567).

En un método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster de acuerdo con el método anterior para provocar la producción de linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. De acuerdo con otra realización, los linfocitos pueden producirse por inmunización in vitro. Después de la inmunización, los linfocitos se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para producir una célula de hibridoma. Las células de hibridoma, producidas de la manera anterior, pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células del mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), es decir, sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

Las células preferidas, usadas como componentes para la fusión de células de mieloma, son aquellas que se fusionan de manera eficiente, apoyan la producción estable de anticuerpos de alto nivel por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio donde se seleccionan las células parentales no fusionadas.

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Una vez que se identifican las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y cultivarlos mediante métodos estándar. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer in vivo como tumores de ascitis en un animal, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal (i.p.) de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante técnicas de purificación de anticuerpos convencionales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (p. ej., utilizando proteína A o proteína G-Sepharose) o intercambio de iones, cromatografía, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas

oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped como las células de *E. coli*, las células COS de simio, las células de ovario de hámster chino (CHO) o las células de mieloma que no producen proteínas de anticuerpos sin ser transfectadas, y así obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes.

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos pueden aislarse de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) mediante la combinación aleatoria de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como estrategia para la construcción bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nucl. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, para producir polipéptidos de anticuerpos de fusión o quiméricos, por ejemplo, sustituyendo las secuencias de la región constante de la cadena pesada y la cadena ligera (CH y CL) por las secuencias murinas homólogas (US 4816567 y Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 81: 6851 (1984), o mediante fusión covalente de la secuencia codificante de la inmunoglobulina con la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias polipeptídicas que no son de inmunoglobulina pueden sustituirse por las regiones constantes de un anticuerpo, o pueden ser sustituidas por los dominios variables de un centro de unión al antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de unión al antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de unión al antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

Anticuerpos humanizados

Los métodos para producir anticuerpos de animales no humanos "humanizados" son bien conocidos en la técnica. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos integrales introducidos en el mismo desde una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan residuos "importados" porque

normalmente se toman de una región variable "importada". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y coautores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, estos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (US 4816567) en los cuales una región, que es sustancialmente menor que una región variable humana intacta, ha sido sustituida por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos Los residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de regiones análogas en los anticuerpos de roedores.

La elección de regiones variables humanas, tanto ligeras como pesadas, para ser usadas en la producción de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano anti-ratón) cuando el anticuerpo está destinado para su uso terapéutico en seres humanos. De acuerdo con el llamado método del "ajuste óptimo", la secuencia de la región variable de un anticuerpo de roedor se analiza contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano más cercana a la del roedor y se selecciona la región marco humana (FR), que es adecuada para su uso en el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.* 151: 2296). (1993). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas de todos los anticuerpos humanos. El mismo marco se puede usar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 89: 4285 (1992).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad de unión al antígeno y otras propiedades biológicas significativas. Para este fin, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante el análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados utilizando modelos conceptuales tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensionales, que les son familiares a los expertos en la técnica. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran posibles estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas imágenes permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse al antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar con el receptor y las secuencias de importación para lograr las características de anticuerpo deseadas, como el aumento de la afinidad por el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente involucrados en influir en la unión del antígeno.

El anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo de longitud completa, tal como un anticuerpo IgG1 de longitud completa.

Anticuerpos humanos y metodología basada en biblioteca de presentación de fagos

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, después de la inmunización, de producir una gama completa de anticuerpos humanos sin producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de cadena pesada (*antibody heavy-chain joining región* -JH) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal produce una inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal da como resultado la producción de anticuerpos humanos después del desafío con antígeno (US 5545806, 5569825, 5591669 (todos de GenPharm); 5545807; y WO 97/17852).

Alternativamente, la tecnología de visualización de fagos (McCafferty et al., Nature, 348: 552-553 (1990) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro del repertorio de genes de la región variable de inmunoglobulina (V) de cuerpos de donantes inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de la región V del anticuerpo se clonan dentro del marco con ya sea una mayor o menor gen envoltura de la proteína del gen de un bacteriófago filamentoso, como M13 o fd, y se exhiben como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de una partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección de un gen que codifica un anticuerpo que exhibe dichas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de las células B. La visualización de fagos puede realizarse en una variedad de formatos. Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen V para la visualización de fagos. Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron varias matrices de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados del bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra una variedad diversa de antígenos (incluidos los antígenos propios) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991).

Como se describió anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden generarse por células B activadas in vitro (véanse los documentos US 5567610 y 5229275).

Fragmentos de anticuerpos

En ciertas circunstancias, es recomendable utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos completos. Los pequeños tamaños de los fragmentos contribuyen a su rápida eliminación y pueden contribuir a una mejor penetración en tumores densos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos eran derivados de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos. Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente por células huéspedes recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse y secretarse a partir de *E. coli*, lo que permite facilitar la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Según otra realización, los fragmentos Fab'-SH pueden aislarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de células huéspedes recombinantes. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con residuos de receptores de unión al epítipo de retención de vida media aumentados in vivo se describen en el documento US 5869046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la técnica. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv) (véanse los documentos WO 93/16185; US 5571894 y US 5587458). Fv y scFv son las únicas especies con sitios de unión intactos que están desprovistos de regiones constantes; como resultado, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión scFv pueden construirse para producir la fusión de una proteína efectora en N o C terminal de un scFv. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en el documento U.S. 5641870. Tales fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidad de unión por al menos dos epítopos diferentes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden unirse a dos epítopos diferentes de la proteína del anticuerpo anti-IL-5R α . Otros anticuerpos biespecíficos pueden combinar un sitio de unión del anticuerpo anti-IL-5R α en combinación con un sitio de unión para otra proteína. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, $F(ab')_2$ de anticuerpos biespecíficos).

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen

diferentes especificidades. Debido a la selección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante cromatografía de afinidad en varios pasos, es bastante complicada y el rendimiento del producto es bajo. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables con la especificidad de unión deseada (sitios de unión al antígeno de un anticuerpo) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión se realiza con una región constante de cadena pesada Ig, que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, C_{H2} y C_{H3} . Preferiblemente, la primera región constante de cadena pesada (C_{H1}) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera está presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en varios vectores de expresión y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en la selección de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que se usan relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos en la construcción para proporcionar rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación en dos o en las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales produce altos rendimientos, o cuando las relaciones no tienen un efecto significativo.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos son una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida que proporciona una primera especificidad de unión en una primera rama, y un par de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en una segunda rama. Se comprobó que esta estructura asimétrica facilita la separación de la molécula biespecífica deseada de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo la mitad de la molécula biespecífica facilita la separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690. Para más detalles con respecto a la producción de anticuerpos biespecíficos, ver, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento US 5731168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede construir para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se obtienen a partir de cultivos de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte de la región C_{H3} . De acuerdo con este método, uno o más aminoácidos pequeños con cadenas laterales de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan con

cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo al reemplazar los aminoácidos que contienen cadenas laterales grandes por aminoácidos que contienen cadenas laterales más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de heterodímero en comparación con otros productos finales no deseados.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o heteroconjugados. Por ejemplo, uno de los anticuerpos heteroconjugados se puede acoplar a la avidina, y el otro a la biotina. Dichos anticuerpos pueden usarse, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (US 4676980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en el documento US 4676980, junto con diversas técnicas de reticulación.

Las técnicas para producir anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando un enlace químico. Brennan et al., Science 229: 81 (1985) han descrito un procedimiento, según el cual los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para producir $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, como el arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. Los fragmentos Fab' producidos se convierten luego en derivado de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte luego en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los recientes progresos han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para producir anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Medicine. 175: 217-225 (1992) describen la producción de $F(ab')_2$ de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito varias técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina (Kostelny et al, J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron al Fab' de dos diferentes anticuerpos por fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se oxidaron nuevamente para formar los

heterodímeros de anticuerpos. Este método también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) es un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden una región VH conectada a una región VL por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, las regiones VH y VL de un fragmento tienen que emparejarse con las regiones complementarias VL y VH de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos utilizando dímeros de cadena única (Fv) - (sFv) (ver Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994)).

La invención también proporciona anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos trispecíficos o tetraspecíficos.

Anticuerpos polivalentes

Un anticuerpo polivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) por una célula que expresa un antígeno, al que se une el anticuerpo, más rápido que un anticuerpo bivalente. Los anticuerpos propuestos en este documento pueden ser anticuerpos polivalentes (que son distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. . El anticuerpo polivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) un fragmento Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá un fragmento Fc y tres o más sitios de unión al antígeno en el extremo N del fragmento Fc. El anticuerpo polivalente preferido en el presente documento comprende (o consiste en) 3 a aproximadamente 8, pero preferiblemente 4, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo polivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), en donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más regiones variables. Por ejemplo, la cadena o las cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1- (X1) n-VD2- (X2) n-Fc, en donde VD1 se refiere a una primera región variable, VD2 se refiere a una segunda región variable, Fc se refiere a una cadena polipeptídica de un fragmento Fc, X1 y X2 se refieren a un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la o las cadenas polipeptídicas pueden comprender la siguiente cadena: enlazador flexible VH-CH1-VH-CH1- Fragmento de Fc; o fragmento VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo polivalente en el presente documento preferiblemente comprende además al menos 2 (y preferiblemente 4) polipéptidos de región variable de cadena ligera. El anticuerpo polivalente en el presente documento puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente 2 a aproximadamente 8

polipéptidos de región variable de cadena ligera. En el contexto de la presente invención, los polipéptidos de región variable de cadena ligera comprenden una región variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además una región CL.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo específico de IL-5R α como ingrediente activo (o como el único ingrediente activo). La composición farmacéutica puede incluir al menos un anticuerpo que es específico para IL-5R α y/o una o más moléculas de unión adicionales (por ejemplo, anticuerpos) que se dirigen a uno o más de los receptores de superficie correspondientes, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las composiciones pretenden mejorar, prevenir o tratar trastornos que pueden resultar de la interacción de IL-5 y su receptor celular.

"Composición farmacéutica" significa una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-5R α de la presente invención y al menos uno de los componentes seleccionados del grupo que consiste en excipientes farmacéuticamente aceptables y compatibles farmacológicamente, tales como rellenos, solventes, diluyentes, vehículos, auxiliares, agentes de distribución, agentes de administración, conservantes, estabilizantes, emulsionantes, agentes de suspensión, espesantes, controladores de administración prolongada, cuya elección y proporciones dependen del tipo y la vía de administración y la dosis. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención y los métodos de preparación de las mismas serán sin duda evidentes para los expertos en la técnica. Las composiciones farmacéuticas deben fabricarse preferiblemente de acuerdo con los requisitos de GMP (Good Manufacturing Practice/Buenas Prácticas de Fabricación). La composición puede comprender una composición tampón, agentes de tonicidad, estabilizantes y solubilizantes. La acción prolongada de la composición se puede lograr mediante agentes que disminuyen la absorción del ingrediente farmacéutico activo, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Los ejemplos de vehículos, disolventes, diluyentes y agentes de administración adecuados incluyen agua, etanol, polialcoholes y sus mezclas, aceites y ésteres orgánicos para inyecciones.

"Medicamento (fármaco)": es un compuesto o una mezcla de compuestos como una composición farmacéutica en forma de tabletas, cápsulas, polvos, liofilizados, inyecciones, infusiones, pomadas y otras formas listas para restauración, mejora o modificación de las funciones fisiológicas. En humanos y animales, y para el tratamiento y prevención de enfermedades, para diagnósticos, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros. Cualquier método para administrar péptidos, proteínas o anticuerpos que se acepte en la técnica puede emplearse adecuadamente para un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención.

El término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a uno o más componentes líquidos o sólidos compatibles que son adecuados para la administración en un mamífero, preferiblemente un ser humano.

El término "excipiente" se usa en el presente documento para describir cualquier ingrediente distinto de los ingredientes anteriores de la invención. Estas son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la fabricación farmacéutica para dar a los productos farmacéuticos las propiedades fisicoquímicas necesarias.

Como se usa en el presente documento, "tampón", "composición del tampón", "agente de tamponamiento" se refiere a una solución, que es capaz de resistir los cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados de base ácido, y que permite al fármaco anticuerpo anti-IL-5R α resistir cambios en el pH. En general, la composición farmacéutica tiene preferiblemente un pH en un rango de 4,0 a 8,0. Los ejemplos de tampones usados incluyen, pero no se limitan a, soluciones tampón de acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato, etc.

Los términos "agente tónico", "osmolito" o "agente osmótico", como se usan en este documento, se refieren a un excipiente que puede aumentar la presión osmótica de una formulación de anticuerpo líquida. El medicamento "isotónico" es un medicamento que tiene una presión osmótica equivalente a la de la sangre humana. Los medicamentos isotónicos típicamente tienen una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm/kg. Los agentes isotónicos utilizados incluyen, pero no se limitan a, polioles, sacáridos y sacarosa, aminoácidos, sales metálicas, por ejemplo, cloruro de sodio, etc.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo. Los estabilizadores incluyen aminoácidos, por ejemplo, pero no se limitan a, arginina, histidina, glicina, lisina, glutamina, prolina; tensioactivos, por ejemplo, pero no se limitan a, polisorbato 20 (nombre comercial: Tween 20), polisorbato 80 (nombre comercial: Tween 80), polietilen-polipropilenglicol y sus copolímeros (nombres comerciales: Poloxamer, Pluronic, dodecil sulfato de sodio (SDS); antioxidantes, por ejemplo, pero no se limitan a, metionina, acetilcisteína, ácido ascórbico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso, etc.; agentes quelantes, por ejemplo, pero no se limitan a, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminotraacético (DTPA), citrato de sodio, etc.

Una composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante la vida útil especificada a la temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de 2–8°C. Preferiblemente, el agente activo conserva tanto la estabilidad física como la química, así como la actividad biológica. El período de almacenamiento se regula según los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

Una composición farmacéutica de la invención puede fabricarse, envasarse o venderse ampliamente en forma de una dosis unitaria única o una pluralidad de dosis unitarias únicas en forma de una formulación preparada. El término "dosis unitaria única", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que contiene una

cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo es típicamente igual a la dosis del ingrediente activo que se administra en un sujeto, o una porción conveniente de dicha dosis, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son típicamente adecuadas para administración parenteral como formulaciones estériles destinadas a la administración en un cuerpo humano a través de la ruptura en la piel o las barreras de la mucosa, sin pasar por el tracto gastrointestinal por medio de inyección, infusión e implantación. Por ejemplo, la administración parenteral incluye, entre otras, inyecciones o infusiones subcutáneas, intraperitoneales, intramusculares, intrasternales, intravenosas, intraarteriales, intratecales, intraventriculares, intracraneales, intrasinoviales, transdermales y técnicas de infusión dialítica renal. También se prevé la perfusión regional. Realizaciones preferidas incluyen rutas intravenosas y subcutáneas. Cualquier método para administrar péptidos o proteínas aceptados en la técnica puede emplearse adecuadamente para un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención.

Las formulaciones inyectables se pueden preparar, envasar o vender, sin limitación, en forma de dosis unitaria, como en ampollas, viales, en recipientes de plástico, jeringas precargadas, dispositivos de autoinyección. Las formulaciones para administración parenteral incluyen, entre otras, suspensiones, soluciones, emulsiones en bases oleosas o acuosas, pastas y similares.

En otra realización, la invención proporciona una composición para administración parenteral que comprende una composición farmacéutica que se proporciona en forma seca (es decir, en polvo o granular) para reconstituir con una base adecuada (por ejemplo, agua estéril sin pirógenos) antes de la administración. Dicha formulación puede prepararse, por ejemplo, mediante un proceso de liofilización, que se conoce en la técnica como secado por congelación, y que implica la congelación de un producto seguido de la eliminación del disolvente del material congelado.

El anticuerpo anti-IL-5R α de la invención también se puede administrar por vía intranasal o por inhalación, ya sea solo, como una mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado de un inhalador, como un recipiente de aerosol presurizado, bomba, atomizador, atomizador o nebulizador, en donde se usa o no se usa un propelente adecuado, o como gotas nasales, o aerosol.

Las formas de dosificación para administración parenteral pueden formularse para ser de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Uso terapéutico del anticuerpo anti-IL-5R α de la invención.

En un aspecto, un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención es útil en el tratamiento de trastornos que están asociados con la actividad de IL-5.

En un aspecto, un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención es útil en el tratamiento de la enfermedad o trastorno, en el que se selecciona una enfermedad o trastorno del grupo: asma, por ejemplo, asma eosinófila (asma atópica), por ejemplo, asma eosinofílica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); Síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; Gastroenteritis eosinofílica o síndrome hipereosinofílico.

En un aspecto, el sujeto de tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferiblemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser masculino o femenino, de cualquier edad.

Como se usa en este documento, los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con", en referencia a los anticuerpos anti-IL-5R α y uno o más agentes terapéuticos, significan, se refieren o incluyen lo siguiente:

- 1) la administración simultánea de dicha combinación de un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes están conjuntamente formulados en una dosificación única que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,
- 2) la administración sustancialmente simultánea de dicha combinación de un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados unos de otros, en formas de dosificación separadas, que se toman sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, con lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo en dicho paciente,
- 3) la administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan separados unos de otros en formas de dosificación separadas que se toman en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, con lo cual dichos componentes se liberan en momentos sustancialmente diferentes en dicho paciente; y
- 4) la administración secuencial de dicha combinación de un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención y un agente terapéutico a un paciente que necesita tratamiento, cuando dichos componentes se formulan juntos en una forma de dosificación única que libera dichos componentes de manera controlada, después de lo cual se liberan de forma simultánea, consecutiva o conjunta en el mismo momento y/o en momentos diferentes en dicho paciente, donde cada porción puede administrarse por la misma ruta o por vías diferentes.

Los anticuerpos anti-IL-5R α de la invención pueden administrarse sin tratamiento terapéutico adicional, es decir, como una terapia independiente. Además, el tratamiento con los

anticuerpos anti-IL-5R α de la invención puede comprender al menos un tratamiento terapéutico adicional (terapia de combinación). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IL-5R α puede administrarse con o en combinación con un medicamento diferente/fármaco de enfermedad autoinmune.

En el tratamiento de las enfermedades autoinmunes anteriores o afecciones autoinmunes relacionadas, los anticuerpos anti-IL-5R α aquí propuestos en combinación con un agente terapéutico diferente pueden administrarse en un paciente, utilizando un régimen de múltiples fármacos. El anticuerpo anti-IL-5R α se puede administrar de manera simultánea, secuencial, secuencial o alternativamente con un inmunosupresor, o después de mostrar resistencia a una terapia diferente. Se pueden usar las mismas o menores dosis de inmunosupresores, en comparación con las utilizadas en la técnica. Se deben tener en cuenta muchos factores, incluido el tipo de enfermedad a tratar y el historial médico del paciente, al elegir un inmunosupresor preferido.

Como se usa en el presente documento, el término "agente terapéutico" utilizado en la terapia complementaria se refiere a sustancias dirigidas a suprimir o enmascarar el sistema inmunológico de un paciente, por ejemplo, a moléculas pequeñas, anticuerpos u hormonas esteroides, como los corticosteroides. Dichos agentes pueden ser sustancias que inhiben la producción de citoquinas, regulan negativamente o suprimen la expresión de autoantígenos o enmascaran antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los ejemplos de tales agentes incluyen esteroides, tales como glucocorticoides, por ejemplo prednisona, metilprednisolona y dexametasona; Pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituidas (ver US 4665077), azatioprina (o ciclofosfamida, en caso de reacción adversa a azatioprina); bromocriptina; glutaraldehído (que enmascara antígenos MHC, como se describe en el documento US 4120649); anticuerpos antiidiotípicos contra antígenos de MHC y fragmentos de MHC; ciclosporina A; antagonistas de los receptores de citocinas y citocinas, incluidos los anticuerpos interferón-gamma, beta o alfa; anticuerpos contra el factor de necrosis tumoral; anticuerpos anti-interleuquina-2 y anticuerpos anti-receptor de IL-2; anticuerpos anti-L3T4, globulina heteróloga anti-linfocitos, anticuerpos pan-T, preferiblemente anticuerpos anti-CD3 o anti-CD4/CD4a; péptido soluble que contiene un dominio de unión a LFA-3 (documento WO 90/08187, publicado el 26 de junio de 1990); estreptoquinasa; TGF-p; estreptodiosa; ADN/ARN del huésped; FK506; RS-61443; desoxiespergualina; rapamicina; Receptor de células T (US 5114721); Fragmentos de receptores de células T (Offner et al, Science 251: 430-432 (1991); WO 90/11294; y WO 91/01133); y anticuerpos del receptor de células T (EP 340109), tales como T10B9.

Se entiende que los anticuerpos anti-IL-5R α de la invención se pueden usar en los métodos de tratamiento descritos anteriormente, se pueden usar en el tratamiento descrito anteriormente y/o

se pueden usar en la fabricación de un medicamento para un tratamiento, como se describió anteriormente

Dosificación y vías de administración

El anticuerpo anti-IL-5R α de la invención se administrará en una cantidad que sea eficaz en el tratamiento de la afección en cuestión, es decir, en dosis y durante los periodos de tiempo requeridos para lograr el resultado deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar de acuerdo con factores tales como la condición específica a tratar, la edad, el sexo y el peso de un paciente, y si los anticuerpos anti-IL-5R α se administran solos o en combinación con una o más técnicas adicionales de tratamiento autoinmune o antiinflamatorio.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Una forma de dosificación unitaria como se usa en este documento pretende referirse a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los pacientes/los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico deseado. La especificación de las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada típicamente, y depende directamente de (a) las características únicas de un agente quimioterapéutico y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se debe lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la realización de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los sujetos.

Por lo tanto, un experto en la técnica apreciaría, basándose en la descripción proporcionada en el presente documento, que las dosis y el régimen de dosificación están regulados de acuerdo con métodos bien conocidos en las técnicas terapéuticas. Es decir, la dosis máxima tolerable se puede establecer fácilmente, y la cantidad efectiva que proporciona un efecto terapéutico detectable a un paciente también se puede determinar, al igual que los requisitos temporales para administrar cada agente para proporcionar un efecto terapéutico detectable a un paciente. Por lo tanto, aunque ciertos regímenes de dosis y administración se ejemplifican en el presente documento, estos ejemplos no limitan de ninguna manera las dosis y el régimen de administración que se pueden proporcionar a un paciente al practicar las realizaciones de la invención.

Se debe tener en cuenta que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección a aliviar, y pueden incluir dosis únicas o múltiples. Además, debe entenderse que para

cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio de un profesional médico que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en el presente documento son solo como ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de las composiciones reivindicadas. Además, el régimen de dosificación con las composiciones de esta invención puede basarse en una variedad de factores, que incluyen el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, la afección médica del paciente, la gravedad de la afección, la vía de administración, y el anticuerpo anti-IL-5R α particular empleado. Por lo tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse de forma rutinaria utilizando métodos estándar. Por ejemplo, las dosis pueden ajustarse en función de parámetros farmacocinéticos o farmacodinámicos, que pueden incluir efectos clínicos tales como efectos tóxicos y/o valores de laboratorio. Por lo tanto, la presente invención abarca la escalada de dosis intra-paciente según lo determinado por el experto en la materia. Los métodos para determinar las dosis y los regímenes apropiados son bien conocidos en la técnica y un experto en la técnica los entenderá una vez que se proporcionen las ideas descritas en el presente documento.

Se proporcionan ejemplos de métodos de administración adecuada.

Se cree que una dosis adecuada de un anticuerpo anti-IL-5R α de la invención estará en el rango de 0.1-200 mg/kg, preferiblemente 0.1-100 mg/kg, incluyendo aproximadamente 0.5-50 mg/kg, por ejemplo alrededor de 1-20 mg/kg. El anticuerpo anti-IL-5R α se puede administrar, por ejemplo, en una dosis de al menos 0,25 mg/kg, tal como al menos 0,5 mg/kg, incluyendo al menos 1 mg/kg, por ejemplo, al menos 1, 5 mg/kg, tal como al menos 2 mg/kg, por ejemplo, al menos 3 mg/kg, incluyendo al menos 4 mg/kg, por ejemplo, al menos 5 mg/kg; y, por ejemplo, hasta un máximo de 50 mg/kg, incluyendo hasta un máximo de 30 mg/kg, por ejemplo, hasta un máximo de 20 mg/kg, incluyendo hasta un máximo de 15 mg/kg. La administración generalmente se repetirá en intervalos de tiempo apropiados, como una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, y durante el tiempo que lo considere apropiado un médico responsable, quien puede, en algunos casos, aumentar o reducir la dosis si es necesario.

Artículos de fabricación (productos) y kits

Artículo de fabricación (productos) y kits.

De acuerdo con otra realización, la presente invención proporciona un artículo de fabricación que comprende productos destinados a ser utilizados para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y afecciones relacionadas, tales como asma, por ejemplo, asma eosinófila (asma atópica), por ejemplo, asma eosinófila grave (atópica asma); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); Síndrome de Churg-Strauss; Esofagitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica o síndrome

hipereosinofílico. El producto se presenta en un envase con una etiqueta y un prospecto, puede ser un blíster y/o una cajita. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, viales, ampollas, jeringas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales tales como vidrio o material polimérico. El envase comprende una composición que es eficaz para tratar una determinada condición y puede tener una abertura de acceso estéril. Al menos un ingrediente activo en la composición es un anticuerpo anti-IL-5R α de acuerdo con la invención. La etiqueta y el prospecto indican que el medicamento está destinado a usarse para tratar una determinada afección. La etiqueta y/o el prospecto del paquete contienen además instrucciones para administrar la composición del anticuerpo en un paciente, incluidas indicaciones, frecuencia, dosis, vía de administración, contraindicaciones y/o precauciones para dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la composición está destinada a ser usada para el tratamiento del asma, por ejemplo, asma eosinofílica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinofílica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); Síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinofílica; Gastroenteritis eosinofílica, o síndrome hipereosinofílico.

Además, un artículo de fabricación puede comprender, sin limitación, otros productos necesarios para fines comerciales o necesarios para un consumidor, tales como disolventes, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

La invención también se refiere a kits que pueden usarse para diversos fines, por ejemplo, para purificar o inmunoprecipitar la IL-5R α a partir de células, para aislar células portadoras de IL-5R α . Un kit para el aislamiento y la purificación de anticuerpos anti-IL-5R α o células portadoras de IL-5R α . Un kit puede comprender un anticuerpo anti-IL-5R α asociado con gránulos (por ejemplo, gránulos de sefarosa o partículas magnéticas). Un kit contiene un envase, una etiqueta y un prospecto.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos solo tienen fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en esta especificación se incorporan aquí como referencia. Aunque la invención ha sido descrita con cierto detalle a modo de ilustración y con fines de brindar claridad en su comprensión, resultará evidente para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse al mismo sin apartarse del espíritu o alcance de las realizaciones adjuntas.

Materiales y métodos generales

La información general sobre las secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas humanas se encuentra en: Kabat, EA, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Los aminoácidos de las cadenas de anticuerpos están numerados y se mencionan de acuerdo con la numeración de la UE (Edelman, G.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5° ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991).

Técnicas de DNA Recombinante

Para manipular el ADN se utilizaron métodos estándar, como se describe en Sambrook, J. et al, *Molecular cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Los reactivos de biología molecular se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de genes

Los segmentos génicos deseados se prepararon a partir de oligonucleótidos preparados mediante síntesis química. Los segmentos génicos de 300-4000 kb de longitud, que estaban flanqueados por sitios de restricción singulares, se ensamblaron por hibridación y ligación de oligonucleótidos, incluida la amplificación por PCR, y posteriormente se clonaron a través de los sitios de restricción indicados. Las secuencias de ADN de los fragmentos de genes subclonados se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

Las secuencias de ADN se determinaron mediante secuenciación de Sanger.

Determinación de secuencia de ADN

Análisis de secuencias de ADN y proteínas y gestión de datos de secuencias.

Para la creación de secuencias, mapeo, análisis, anotación e ilustraciones se utilizó Vector NT1 Advance Suite version 8.0, de Informax.

Vectores de expresion

Para la expresión de los anticuerpos y antígenos descritos, se aplicaron variantes de plásmidos de expresión destinados a la expresión en células procarióticas (*E. coli*), expresión

transitoria en células eucarióticas (por ejemplo, en células CHO). Además del casete de expresión de anticuerpos, los vectores contenían: un origen de replicación que permite la replicación de dicho plásmido en *E. coli*, genes que confieren resistencia en *E. coli* a varios antibióticos (por ejemplo, a ampicilina y kanamicina).

Los genes de fusión que comprenden las cadenas de anticuerpos descritas a continuación se generaron mediante PCR y/o síntesis de genes, y se ensamblaron con métodos y técnicas recombinantes conocidos mediante la conexión de los segmentos de ácido nucleico correspondientes, por ejemplo, utilizando sitios de restricción únicos en los vectores correspondientes. Las secuencias de ácidos nucleicos subclonadas se verificaron mediante secuenciación de ADN. Para las transfecciones transitorias, se prepararon mayores cantidades de plásmidos mediante la preparación del plásmido a partir de cultivos de *E. coli* transformados.

Ejemplo 1

Producción de antígenos recombinantes y anticuerpos en suspensión en cultivo de células de mamíferos.

Una secuencia que codifica el dominio extracelular de IL-5R α humano y animal fue clonada en el plásmido pEE con etiquetas EPEA, FC y H6F para producir proteína (Fig. 1, 2,3) en los sitios de restricción SalI/NotI. Se produjeron las cantidades requeridas del plásmido en las células de *E. coli* y se purificaron utilizando el kit Qiagen.

Los antígenos se produjeron en las células de la línea celular establecida obtenida de células de ovario de hámster chino (línea de células CHO-T), los anticuerpos se produjeron en CHO, de acuerdo con los protocolos publicados [Cytotechnology (2012) 64: 613–622]. El cultivo en suspensión se realizó en matraces sobre agitador orbital utilizando medios libres de suero de HyCell TransFx-C suplementado con L-glutamina 8 mM y 1 g/l de pluronic 68. Para la expresión transitoria, se transfectaron células en una concentración de $2-2,2 \times 10^6$ c/ml mediante polietilenimina lineal (PEI MAX, Polysciences). La relación ADN/PEI fue de 1: 3/1: 10. En 5-7 días después de la transfección, el cultivo celular se centrifugó a 2000 g durante 20 min y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. Las proteínas diana se aislaron del líquido de cultivo mediante HPLC afín.

La proteína recombinante que comprende una etiqueta EPEA (ácido glutámico-prolina-ácido glutámico-alanina) en el extremo C de la proteína se aisló utilizando la Matriz de Afinidad de etiqueta C CaptureSelect sorbente. El fluido de cultivo se pasó a través de una columna cromatográfica precargada con 5 ml de sorbente de etiqueta C, luego la columna se lavó con 25 ml de PBS para eliminar cualquier componente de unión no específica. El antígeno unido se eluyó en condiciones moderadas usando Tris 20 mM, MgCl₂ 2 M (pH 7,0-7,4). La proteína se dializó

luego en PBS (pH 7,4) utilizando una membrana de diálisis semipermeable, se filtró (0,22 μ m), se transfirió a tubos y se almacenó a -70°C.

Las proteínas Fc recombinantes se aislaron utilizando 5 ml de sorbente HiTrap rProtein A Sepharose FF (GE Healthcare). La columna se equilibró y luego se lavó con 5 volúmenes de PBS para eliminar los componentes unidos no específicos. El antígeno unido se eluyó con tampón de glicina 0,1 M (pH 3). El pico de elución de la proteína principal se recogió y se llevó a pH neutro con tampón Tris 1 M (pH 8). Todas las etapas se realizaron a una velocidad de flujo de 110 cm/h. Luego, la proteína se dializó en PBS (pH 7,4) utilizando la técnica SnakeSkin Dialysis Tubing, se filtró (0,22 μ m), se transfirió a tubos y se almacenó a -70°C.

Las proteínas recombinantes marcadas con His se aislaron utilizando una columna de Ni-NTA (QIAGEN), el sorbente se lavó tres veces con un tampón de equilibrio (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM (pH 8,0). El pH del líquido de cultivo se ajustó a 8,0; se añadió NiCl₂ a una concentración final de 1 mM. El absorbente se transfirió al fluido de cultivo, se incubó durante 2 horas a 4 °C con agitación y se lavó con diez volúmenes de columna de tampón (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM imidazol), se lavaron con veinte volúmenes de columna (50 mM Na₂HPO₄, 1 M NaCl, 20 mM imidazol), se lavaron con diez volúmenes de PBS (pH 7,4), se eluyeron con 50 mM NaH₂PO₄ 300 mM NaCl, 250 mM imidazol (pH 8,0). La solución de proteína se convirtió en PBS (pH 7,4) y se congeló a -70°C.

La pureza de la solución de proteína obtenida se evaluó por reducción y no reducción SDS-PAGE (Fig. 4, 5, 6).

Ejemplo 2

Ingeniería de una biblioteca de fagos Fab naive de humanos MeganLib™

El ARN total de linfocitos B de muestras de sangre de más de mil donantes humanos individuales fue aislado usando un RNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo con el protocolo sugerido. El ensayo de concentración de ARN fue efectuado con el kit Nanovue (GE Healthcare); La calidad del ARN aislado se sometió a prueba mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%.

La reacción de transcripción inversa se realizó con el kit MMLV RT (Evrogen) de acuerdo con el protocolo recomendado con MMuLV transcriptasa inversa y oligonucleótidos de hexámero aleatorios como cebadores.

Los productos de transcripción inversa se utilizaron como matriz en una reacción en cadena de polimerasa en dos etapas para obtener los genes de dominios variables flanqueados con sitios de restricción; la reacción se realizó utilizando el kit de oligonucleótidos según los protocolos de [J Biol Chem. 1999 25 de junio; 274 (26): 18218-30].

Una vez obtenida la preparación de ADN VL-CK-VH (Fig. 7) se la trató con endonucleasas de restricción NheI/Eco91I y se ligó en el fagémido original pH5 (Fig. 8). Los productos de

ligación se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli* SS320 preparadas de acuerdo con los protocolos [Methods Enzymol. 2000; 328: 333-63.]. El repertorio de la biblioteca de visualización de fagos Fab combinados MeganLib™ fue de 1011 transformantes. Las preparaciones de bibliotecas de fagos Fab se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente [J Mol Biol. 1991 5 de diciembre; 222 (3): 581-97].

Ejemplo 3

Producción de Fabs anti-IL-5R α humanos por visualización de fagos

Se obtuvieron Fab específicos de fagos humanos anti-IL-5R α a partir de la biblioteca de visualización de fagos Fab combinatoria MeganLib™. Se efectuó biopanning en IL-5R α humano mediante la presentación de fagos [Nat Biotechnol. 1996 Mar; 14 (3): 309-14; J Mol Biol. 1991, 5 de diciembre; 222 (3): 581-97], pero utilizando perlas magnéticas y el dispositivo KingFisher Flex debido a que esta técnica permite realizar simultáneamente hasta 96 esquemas y variantes diferentes.

El antígeno IL-5R α biotinilado humano (Fc, EPEA) se inmovilizó a propósito en la superficie de las perlas magnéticas de estreptavidina (NEB) a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la primera ronda, 2 $\mu\text{g/ml}$ para la segunda ronda, 0.4 y 0.2 $\mu\text{g/ml}$ para la tercera ronda y la cuarta ronda, respectivamente. El antígeno se incubó con las perlas durante 1 hora a temperatura ambiente en un rotador. Las perlas se lavaron luego con PBS (pH 7,4), la superficie de las perlas se bloqueó con una solución de leche desgrasada al 2% o BSA al 1% en PBS (pH 7,4) durante 1 hora. La biblioteca de fagos humanos MeganLib™ se diluyó a una concentración de 2×10^{13} partículas de fago/ml en PBS (pH 7,4) con un 2% de leche desgrasada y un antígeno no objetivo que contiene una etiqueta de antígeno diana, y se preseleccionó mediante cuentas magnéticas que no contienen antígeno en la superficie, con el fin de eliminar fagos de unión inespecíficos. Las perlas magnéticas recubiertas con IL-5R α se incubaron luego con MeganLib™ durante 1-2 horas a temperatura ambiente.

Los fagos no unidos se eliminaron mediante varios ciclos de lavado de perlas magnéticas con una solución de PBS (pH 7,4) con Tween 20 al 0,1%. El número de ciclos de lavado se incrementó de ronda en ronda (3 ciclos de lavado en la primera ronda, 9 ciclos de lavado en la segunda ronda, y 15 ciclos de lavado en la cuarta ronda). Los fagos que se unieron al antígeno en la superficie de las perlas magnéticas se eluyeron de las perlas con una solución 100 mM de Gly-HCl (pH 2,2) durante 15 minutos mientras se lo agitaba, luego la solución se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 7,6). Las bacterias de *E. coli* TG1 fueron infectadas con fagos, se cultivaron en medio de cultivo y se utilizaron en el siguiente ciclo de selección. Después de tres o cuatro rondas, se aisló ADN fagémido del cultivo de *E. coli* TG1 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Qiagen). Se usó el inmunoensayo enzimático de fago policlonal (ELISA) para el enriquecimiento

de la biblioteca contra antígenos diana y para evaluar la presencia de partículas de fago no específicas.

Ejemplo 4

Ensayo ELISA de fagos policlonales contra antígenos específicos y no específicos

El antígeno diana IL-5R α -Fc y el no objetivo con proteína de fusión Fc fueron inmovilizados en placas de alta absorción (Greiner-Bio) para realizar el ensayo ELISA. La proteína se añadió en una concentración de 1 μ g/ml y 5 μ g/ml, respectivamente, en NaHCO₃ 0,1 M (pH 9,0) y se tituló con un incremento de 2 a 7 diluciones; las placas selladas se incubaron durante la noche a 4°C. Todos los pasos posteriores se realizaron de acuerdo con el protocolo ELISA estándar utilizando una plataforma robótica de base Tecan Freedom EVO 200 de alto rendimiento (Tecan). Para bloquear uniones no específicas, se añadió un tampón de bloqueo con contenido de 2% de leche desgrasada o BSA al 1% en PBS (pH 7,4) a los pocillos de la placa. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de varios ciclos de lavado con solución salina de fosfato con contenido de Tween 20 (PBST), se agregó 50 μ l por pocillo de fago policlonal del ensayo. Después del lavado, se recubrió cada pocillo (50 μ l/pocillo) con anticuerpo secundario conjugado con anti-M13 HRP (Pierce-ThermoScientific) en PBST (1: 7500). Después de 50 minutos de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con PBST. Se obtuvo señal colorimétrica mediante el agregado de una solución de sustrato (H₂O₂-0.02% y TMB en CH₃COONa pH 5.5) durante 10 minutos; luego se bloqueó el desarrollo del color agregando ácido sulfúrico al 1% (20 μ l). La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise adecuado (Tecan).

El ensayo ELISA de la preparación de fagos policlonales demostró un enriquecimiento significativo después de la tercera y cuarta rondas de selección en el antígeno diana (Fig. 6). Se seleccionaron bibliotecas para la reclonación y para una selección adicional; de ello se observó que la señal excedía 5 veces la dilución mínima de las bibliotecas de fagos para los antígenos de control no homólogos.

Ejemplo 5

Reclonación de genes de dominios variables de anticuerpos en plásmidos de expresión

Reclonación de genes de dominios variables de anticuerpos en un plásmido de expresión (Fig. 9) de un vector fagémido después de llevar a cabo rondas exitosas de selección de acuerdo con un protocolo estándar que utiliza la técnica ligación y restricción.

Posteriormente, los vectores de expresión que comprendían fragmentos de anticuerpos se transformaron en la cepa BL21-Gold de E. coli para el análisis comparativo de la afinidad de los

fragmentos de anticuerpos variables a partir de bibliotecas de visualización a antígeno mediante la técnica ELISA, utilizando la plataforma de diagrama de flujo Mabnext.

Ejemplo 6

Selección de clones de alta afinidad a partir de bibliotecas de post-selección, que se unen específicamente al IL-5R α humano

Se produjeron los Fab de acuerdo con la técnica estándar: células bacterianas *E. coli* BL21-Gold fueron transformadas con vectores de expresión que contenían genes Fab, y la posterior adición de un inductor produjo la transcripción del operón lac, por lo que, al cultivar los transformantes resultantes, se produjo la expresión de Fabs que fueron exportados al espacio periplásmico. Luego se realizó el test ELISA para verificar la unión de Fab al antígeno IL-5R α -EPEA inmovilizado en el sustrato a una concentración de 0.2 μ g/ml en placas (medio de unión de Greiner bio one) en NaHCO₃ 0.1 M (pH 9.0) (el antígeno se inmovilizó durante la noche) a 4°C). La secuencia de Fab Benralizumab (Medimmune) insertada en el plásmido de expresión pLL se utilizó como control positivo. Todos los pasos adicionales se realizaron a temperatura ambiente de acuerdo con el protocolo estándar ELISA utilizando una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en los sistemas robóticos Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). El lavado se realizó después de cada paso, con 300 μ l/pocillo 1x PBST en tres repeticiones. Los sitios de unión no específicos en la placa se bloquearon con leche desgrasada al 1% en 1x PBS, después del lavado se añadió analito (60 l/pocillo de sobrenadantes de *E. coli*) representado por sobrenadantes de *E. coli*. Se detectaron complejos inmunológicos utilizando anticuerpos anti-Fab de cabra conjugados con peroxidasa (Pierce-ThermoScientific) (1: 7500). La mezcla cromogénica del sustrato se tiñó agregando 50 μ l de solución de sustrato (H₂O₂-0.02% y TMB en CH₃COONa (pH 5.5) durante 15 minutos. Se utilizaron 25 μ l de H₂SO₄ al 1% para detener la reacción. La señal de color se midió a 450 nm utilizando un lector de placas Tecan-Sunrise adecuado (Tecan). La unión del anticuerpo fue proporcional a la señal producida. Los clones en los que una señal de color excedía la señal del anticuerpo de control fueron sometidos a ensayo mediante ELISA contra uniones no específicas.

Ejemplo 7

Análisis de la unión no específica de los Fab seleccionados a diferentes antígenos

También se empleó el protocolo ELISA para analizar la unión no específica de los Fab en cuestión a diferentes antígenos. El análisis se realizó como se describió anteriormente, pero se usaron IL6R-Fc, PCSK9-VG-FE in 0.1 M NaHCO₃ (pH 9.0) como antígenos para la inmovilización (el antígeno se inmovilizó durante la noche a 4°C). Se utilizaron IL-5R α -FE, IL-5R α -Fc como control de unión específica (el antígeno se inmovilizó durante la noche a 4°C). Todas

las etapas adicionales se realizaron de acuerdo con el protocolo ELISA estándar con una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en sistemas robóticos como Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Los clones en los que la señal de color no excedía la señal de control fueron verificados con el protocolo ELISA competitivo para identificar Fabs que bloqueaban la interacción receptor-ligando.

Ejemplo 8

Selección de Fab de alta afinidad que bloquean la interacción de IL-5R α con el ligando IL-5

Se usó el protocolo ELISA competitivo para probar Fabs específicos antihumanos previamente seleccionados contra la capacidad de bloquear la interacción de IL-5R α con el ligando IL-5 (Sino Biological). Se utilizaron Fab con secuencia publicada, Benralizumab (Medimmune), como control positivo.

Se inmovilizaron 50 μ l/pocillo de IL-5 (solución de 1 μ g/ml en NaHCO₃, pH 9.0) en placas de pocillos ELISA (medio de unión, Greiner bio one) y se incubaron durante la noche a 4°C. Todas las etapas adicionales se realizaron de acuerdo con los protocolos ELISA estándar a temperatura ambiente utilizando una plataforma automatizada de alto rendimiento basada en los sistemas robóticos Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) y Tecan Freedom EVO 200 (Tecan). Las uniones no específicas fueron bloqueadas agregando un tampón de bloqueo (200 μ l de leche desgrasada al 1% en PBS).

En paralelo, el sobrenadante celular que comprendía el ensayo de Fab y IL-5R α (a una concentración final de 1 μ g/ml en PBST) fue mezclado en una proporción de 1: 1 en placas no absorbentes, incubándose durante 45 minutos a temperatura ambiente.

Después de lavar del tampón de bloqueo, la mezcla preincubada fue transferida a la placa. Todos los pasos adicionales fueron similares a los descritos en el ejemplo 6. Los clones que mostraron bloqueo en el nivel de control Fab Benralizumab fueron anotados como positivos y se usaron en ensayos posteriores.

Los genes de dominios variables de los clones positivos se secuenciaron de acuerdo con los protocolos estándar en Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y fueron analizados.

Ejemplo 9

Selección de Fabs de alta afinidad por nivel de disociación.

El análisis de Koff se realizó utilizando Pall Forte Bio Octet Red 96. Los biosensores anti-FABCH1 fueron rehidratados durante 30 minutos en un tampón de trabajo que incluía PBS 10 mM (pH 7,2-7,4), Tween 20 al 0,1% y BSA al 0,1%. Se añadió tampón de trabajo a las muestras de

prueba de sobrenadantes de *E. coli* hasta una concentración final del 10%. Los biosensores anti-FABCH1 se sumergieron luego en sobrenadantes de *E. coli* que contenían Fab de anticuerpos candidatos y se incubaron durante 12 horas a 4°C. Los sensores con Fab inmovilizados en la superficie se transfirieron a los pocillos con un tampón de trabajo, donde se registró una línea de base (60 s). Luego, los sensores se transfirieron a los pocillos con una solución de analito (IL-5R α -Fc, 30 μ g/ml) para lograr la asociación antígeno-anticuerpo (300 s). Los sensores fueron luego devueltos a los pocillos que contenían el tampón de trabajo para una mayor disociación (600 s.). Los sensores usados fueron sometidos a regeneración al concluir de cada prueba: fueron colocados tres veces en tampones de regeneración (10 mM de Gly-HCl, pH 1.7) y luego fueron usados en experimentos adicionales. Las curvas obtenidas fueron analizadas utilizando el Octet Data Analysis (versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar, con modelo de interacción local 1: 1.

Ejemplo 10

Preparación de anticuerpos de longitud completa.

La clonación se realizó mediante la técnica estándar. Una secuencia de dominio variable de cadena pesada se clonó en el vector pEE-Hc IgG1 en los sitios de restricción Sal1/Nhe1. Se clonó un dominio variable de cadena ligera en el vector pEE-CK en los sitios de restricción Sal1/BsiW1. Las construcciones genéticas obtenidas se transfirieron para la producción transitoria de proteínas en la línea celular CHO. Las proteínas se aislaron y se purificaron de acuerdo con los métodos estándar mediante cromatografía de afinidad en Proteína A bacteriana como se describe en el Ejemplo 1. La electroforesis se realizó en PAGE al 12% desnaturizante suplementado con mercaptoetanol y PAGE nativo al 8% (Fig. 6).

Ejemplo 11

Determinación de la afinidad de los anticuerpos de longitud completa en Forte Bio Octert RED 384

Se realizó un estudio experimental de la afinidad de unión de anticuerpos al antígeno IL-5R α humano en Forte Bio Octert RED 384. Se inmovilizó IL-5R α humano a una concentración de 20 μ g/ml en la superficie de los sensores AR2G (ForteBio) de acuerdo con un protocolo estándar y las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó a 30°C utilizando PBS con contenido de 0,1% de Tween 20 y 0,1% de BSA como tampón de trabajo. Después de registrar la base de referencia, se sumergieron los sensores en pocillos que contenían la solución de los anticuerpos durante 300 segundos, donde se relacionó el complejo. La disociación del complejo en solución tampón fue luego detectada durante 600 segundos.

Se analizaron las curvas de unión después de sustraer una señal de referencia; para ello se utilizó el software Octet Data Analysis (Versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar y utilizando el modelo de interacción global 1: 1. Los anticuerpos anti-IL-5R α se unen específicamente al antígeno humano con alta afinidad. Tabla A (Fig. 11, 12, 13)

Nombre	KD (M)	Error KD
BCD133-03-002	5,27E-10	3,94E-12
BCD133-03-020	6,67E-10	6,03E-12
BCD133-03-021	2,24E-11	1,29E-12

Tabla A. Constantes de disociación BCD-133(03-002, 03-020, 03-021) dissociation constants.

Ejemplo 12

Preparación de una línea celular estable que expresa IL-5R α

Se cultivó la línea celular CHO-K1 en un medio DMEM/F12 con 5% de FBS. La transfección de la construcción génica que comprende el ADN que codifica IL-5R α se realizó utilizando TurboFect de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Tres días después de la transfección, el cultivo transfectado se seleccionó durante 14 días mediante la adición de higromicina B al medio hasta una concentración final de 250 μ g/ml. Se clonó la población celular obtenida después de la selección. Se seleccionó un clon celular que expresaba IL-5R α según los resultados del análisis del nivel de expresión/homogeneidad de IL-5R, teniendo en cuenta el coeficiente de crecimiento, la homogeneidad de la población y la ausencia de cambios morfológicos.

Ejemplo 13

Comparación del control del anticuerpo afucosilado reproducible y los anticuerpos anti-IL-5R α candidatos en un ensayo de ADCC en células CHO-IL-5R.

La línea celular CHO-IL-5R que expresa de manera estable IL-5R α , y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos se usaron en el ensayo de ADCC. Las células CHO-IL-5R se cultivaron en un medio DMEM/F12 que comprendía glutamina 2 mM, FBS al 5% (suero bovino fetal), gentamicina 0,05 mg/ml e higromicina B a 0,4 mg/ml a 37°C con CO₂ al 5%. Las células se retiraron de la superficie mediante tratamiento con tripsina, se lavaron dos veces en RPMI-1640 con glutamina 2 mM, FBS al 10%. La viabilidad y el número de células se evaluaron utilizando un hemocitómetro después de teñir con azul de tripano. Se preparó una suspensión de células a una concentración de 4 x 10⁵/ml en medio RPMI-1640 con FBS al 10%.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la sangre venosa de donantes sanos con Ficoll por separación de gradiente de densidad. Las células se lavaron dos veces en DPBS y se resuspendieron en medio RPMI-1640 con glutamina 2 mM, FBS al 10% a una densidad de $2 \times 10^6/\text{ml}$.

Se agregó una serie de diluciones de 50 μl de anticuerpos a concentraciones de 0,005 ng/ml a 300 ng/ml a los pocillos de una placa de 96 pocillos para realizar el ensayo de ADCC. Luego se agregaron 50 μl /pocillo de suspensión de células diana, la placa se incubó durante 30 min a 37°C y 5% de CO₂. Se añadieron 50 μl /pocillo de suspensión de células efectoras. La placa se incubó durante 16 horas a 37°C con 5% de CO₂. Después de la incubación, se realizó el ensayo de citotoxicidad utilizando el kit de ensayo CytoTox96®Non-Radio Cytotoxicity.

La eficacia de ADCC se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ADCC} = \frac{\text{Datos experimentales} - \text{antecedentes}}{\text{Lisis completo} - \text{antecedentes}} \times 100\%$$

La mitad de la concentración efectiva máxima (EC50) se calculó utilizando GraphPad Prism 6.0. De acuerdo con el experimento, la eficacia de los anticuerpos anti-IL-5R α candidatos BCD-133-03-002, BCD-133-03-020, BCD-133-03-021 es 1,6 veces mayor que la del anticuerpo Benralizumab (BCD-133 -018-200617). Los candidatos no muestran una diferencia significativa en la eficacia entre sí con relación con Benralizumab.

Los resultados se muestran en la Fig. 14,15.

Ejemplo 14

Análisis de las interacciones con los receptores IL-5R α de mono cynomolgus/ conejo/ratón en Forte Bio Octet RED 384

Se realizó un estudio experimental de la afinidad de unión de anticuerpos al antígeno IL-5R α en animales en Forte Bio Octet RED 384. Se inmovilizaron anticuerpos a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la superficie de los sensores AR2G (Forte Bio) de acuerdo con un protocolo estándar y las instrucciones del fabricante. El análisis se realizó a 30°C utilizando PBS que comprendía 0,1% de Tween 20 y 0,1% de BSA como tampón de trabajo. Después del registro de referencia, los sensores se sumergieron en pocillos que contenían solución de antígeno (IL-5R α de animales) durante 300 segundos, donde se asoció el complejo. La disociación del complejo en solución de tampón fue luego detectada durante 600 segundos.

Las curvas de unión, después de restar una señal de referencia, se analizaron utilizando el software de Octet Data Analysis (Versión 9.0) de acuerdo con el procedimiento estándar y utilizando el modelo de interacción global en 1:1. Los anticuerpos anti-IL-5R α se unen específicamente al antígeno de mono cynomolgus. Tabla B. Fig. 16,17,18.

Nombre	KD (M)	Error KD
BCD133-03-002	5,53E-09	1,21E-10
BCD133-03-020	1,22E-08	2,30E-10
BCD133-03-021	1,68E-08	4,55E-10

Tabla B. La tabla muestra las constantes de disociación de los anticuerpos contra el antígeno de mono cynomolgus (IL-5R α)

Los anticuerpos no interactúan con el IL-5R α de ratones y conejos.

Ejemplo 15

Generación de una línea celular estable, producción y purificación de anticuerpos anti-IL-5R

Se obtuvo una línea celular estable para la producción del anticuerpo monoclonal BCD-133 mediante la transfección con electroporación usando el nucleofector 4D (Lonza) de la línea celular de suspensión parental CHO-K1-S con construcciones de vectores que comprendían la proporción óptima de cadenas de anticuerpos ligeras y pesadas. Se obtuvieron linajes clonales de alto nivel (más de 1000 mg/l) usando la plataforma robótica ClonePix (Molecular Devices) y los pasos preliminares de selección de minipool utilizando antibióticos en diferentes formatos de cultivo. El análisis cuantitativo se realizó utilizando el sistema analítico Octet QK System (Pall Life Sciences). El medio de base y el esquema de cultivo fueron seleccionados en un sistema automatizado de Tecan Genesis Workstation RSP 200/8 Sistema Automático de Manejo de Líquidos (Tecan) seguido de procesamiento matemático con software MODDE. El productor se cultivó utilizando medios libres de suero y alimento sin contenido de proteínas derivadas de animales. El BCD-133 para estudios preclínicos fue preparado en un fermentador de 50 L y biorreactor de un solo uso de HyClone (Thermo Fisher Scientific).

El fluido de cultivo fue clarificado en un filtro de profundidad Millistak C0HC (Merck-Millipore). La purificación primaria del anticuerpo obtenido del medio de cultivo clarificado se realizó en un absorbente de afinidad de proteína A. La proteína diana se eluyó específicamente con tampón de glicina pH 3.3-3.8 en condiciones ácidas. El eluato recogido se expuso a un pH ácido durante 30-60 minutos para lograr la inactivación viral y luego se neutralizó con una solución de Tris-OH 1M a un pH de 6.5-7.0. La purificación cromatográfica final para eliminar el ADN residual, las proteínas celulares productoras, el ligando del sorbente afín liberado, los agregados y los fragmentos de anticuerpos se realizó utilizando el sorbente CaptoAdhere (GE HealthCare LifeSciences) en un modo de flujo continuo. Para este fin, la solución de proteína se hizo fluir a través de sorbente preparado de un pH 6.5-7.0, a baja conductividad (<3 ms/cm²). La proteína

purificada se sometió luego a filtración para la eliminación de virus utilizando el kit de filtro Viresolve PRO (Millipore), concentración y diafiltración contra el tampón final que contenía acetato de tampón (pH 5.0-5.5) y trehalosa. La concentración de proteína fue de 50 mg/ml y mayor.

Ejemplo 16

Modelado in silico del anticuerpo BCD-133/complejo IL-5R α humano

Para crear anticuerpos mutantes BCD-133 específicos contra IL-5R α , se realizó un análisis estructural en 3D, utilizando el software Schrodinger Suite versión 2017-1 (Schrodinger). Se seleccionó una estructura depositada en el Protein Data Bank bajo el código de identificación: 3VA2 como estructura cristalina objetivo. El acoplamiento se realizó utilizando la herramienta PIPER del software Schrodinger Suite. La selección de las posiciones óptimas se llevó a cabo utilizando la estimación de energía libre (método MM-GBSA) en el intervalo de dinámica molecular de 25 nanosegundos (instrumento Desmond de D.E. Shaw Research). La estructura obtenida se visualizó utilizando la herramienta Maestro (Schrodinger). Un modelo que incluye los dominios variables de BCD-133 se muestra en la FIG. 19, 20.

	Posiciones involucradas en la interacción con la IL-5Ra en humanos	Posiciones de IL-5Ra de humanos involucradas en la interacción con BCD-133
VH BCD-133	Lys55	Asn104
		Gln103
	Ser56	Leu108
	Thr57	His106
		Ser107
	Thr97	Asp76
	Asn98	
	Val100A	
	Tyr99	Glu74
		Asn70
		Lys68
	Gly100	
	Tyr99	Ile69

VL BCD-133	Ser95A	Leu108
	Gly95B	
	Ser95A	Ser107
	Asp50	Glu74
	Asp32	Lys68
	Ser30B	Ser112
	Tyr31	
	Ser30B	Trp113
	Gly30C	
	Tyr31	
		Arg99
	Tyr91	
	Tyr31	Ser111
		Ala110
	Tyr91	
	Ser93	Ala110
		Leu109
	Ser95A	

Tabla C. La columna central muestra los residuos de aminoácidos del anticuerpo BCD-133, que forman una interacción con el IL-5R α humano. La columna del lado derecho muestra los residuos de aminoácidos correspondientes del antígeno IL-5R α , que interactúan con el anticuerpo BCD-133.

Ejemplo 17

Construcción de la biblioteca de anticuerpos mutantes BCD-133 específicos para IL-5R α humano

Para crear anticuerpos mutantes BCD-133 específicos para IL-5R α , se realizó un análisis estructural 3D utilizando el software Schrodinger Suite versión 2017-1 (Schrodinger) y el modelo IL-5R α (PDB 3VA2) (ver también el Ejemplo 16). Sobre la base de un modelo computacional, se creó un conjunto de estructuras en 3D del complejo anticuerpo/IL-5R α ; cada estructura 3D contiene no más de 6 sustituciones de aminoácidos para modificar la afinidad del anticuerpo y la estabilidad del complejo. En el paso siguiente, el conjunto resultante de estructuras formó una

biblioteca que contiene variantes en las que las sustituciones dieron como resultado una mayor estabilidad del complejo y una mayor afinidad del anticuerpo.

En la siguiente tabla, se determinaron las CDR utilizando la asignación canónica de Chothia y no utilizando la clasificación de Kabat más común, como lo indican las CDR que comprenden secuencias de SEQ ID NO: 1-3, 6-8, ya que este algoritmo de agrupamiento define mejor los bucles en la estructura del anticuerpo en comparación con otras variantes (Chothia et al. (1997) <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283697913541?via%3Dihub>). Por lo tanto, se utilizó ese método de agrupamiento para modificar la afinidad del anticuerpo.

Una biblioteca de anticuerpos obtenida según el protocolo anterior incluye 71 secuencias de anticuerpos. Se sustituyeron 16 posiciones. 9 de 16 son regiones CDR de cadena ligera, y las otras 7 posiciones son regiones CDR de cadena pesada. El número de sustituciones únicas es 60. La Tabla D muestra las secuencias de CDR de los bucles candidatos originales, así como un conjunto de sustituciones de aminoácidos que se muestran en cada una de las 71 secuencias mutantes. Las secuencias de los bucles de CDR mutantes de la biblioteca se pueden resumir de la siguiente manera:

	H1	H2	H3	L1	L2	L3
Initial sequence	GFTFSNY	NSGGKS	YATNYGVYPYFGS	SGSRSNIGSGYDVH	DDNNRPS	QSYDSSLSGHWV
Mutant1	-----	-L-T--	--R-----L-	I-----	-----	----W-----
Mutant2	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----HY-----
Mutant3	-----	-W----	-----H-	--C-----	---H---	----LY-----
Mutant4	-----	-W----	-----H-	--H-----	---H---	----LY-----
Mutant5	-----	-W----	-----H-	--L-----	---H---	----LY-----
Mutant6	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----NY-----
Mutant7	-----	-W-T--	--R-----L-	W-----	-----	----E-----
Mutant8	-----	-W-T--	--R-----L-	R-----	-----	----E-----
Mutant9	-----	-F----	-----H-	--E-----	---H---	----LY-----
Mutant10	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----FY-----
Mutant11	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----EY-----
Mutant12	-----	-W-T--	--L-----L-	W-----	-----	----E-----
Mutant13	-----	---H---	-----R-	I--IQ-----	-----	-----R-----
Mutant14	-----	-H-T--	--L---H---L-	W-----	-----	-----
Mutant15	----Q--	--M---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant16	-----	-W----	-----H-	--E-----	-----	----LY-----
Mutant17	-----	-L----	-----H-	--E-----	---H---	----LY-----
Mutant18	-----	-H----	-----H-	--E-----	---H---	----LY-----

Mutant19	-----	-MH---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant20	-----	-H-T--	--L-----L-	W-----	-----	----E-----
Mutant21	-----	-MH---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant22	-----	-Q----	-----H-	--E-----	---H---	----LY-----
Mutant23	-----	--H---	-----Y-	W-R-----	---R---	----H-----
Mutant24	-----	-MQ---	-----Y-	V-----	---R---	-----
Mutant25	-----	-MQ---	-----Y-	Q-----	---R---	-----
Mutant26	-----	-MQ---	-----	Q-R-----	---R---	-----
Mutant27	-----	-MQ---	-----	V-R-----	---R---	-----
Mutant28	-----	-MM---	-----Y-	F-----	---R---	-----
Mutant29	-----	-MQ---	-----Y-	E-R-----	---R---	-----
Mutant30	---Q--	--M---	-----Y-	H-----	---R---	-----
Mutant31	---Q--	--H---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant32	-----	-MC---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant33	-----	-MV---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant34	-----	-W-T--	--R-----L-	I-----	-----	----E-----
Mutant35	-----	-MQ---	-----Y-	Q-R-----	---R---	-----
Mutant36	-----	-MQ---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant37	-----	-MQ---	-----Y-	N-R-----	---R---	-----
Mutant38	-----	-MS---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant39	-----	-MM---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant40	---Q--	--I---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant41	-----	--M---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant42	---Q--	--M---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant43	---Q--	--L---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant44	---Q--	--M---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant45	-----	-YH---	-----	W-RI-----	-----	----M-----

Mutant46	-----	-MQ---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant47	----Q--	--M---	-----Y-	C-R-----	---R---	-----
Mutant48	-----	-ME---	-----Y-	W-----	---R---	-----
Mutant49	----Q--	--M---	-----Y-	L-R-----	---R---	-----
Mutant50	-----	-ME---	-----	W-R-----	---R---	-----
Mutant51	-----	--M---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant52	-----	--Q---	-----Y-	Q-R-----	---R---	-----
Mutant53	----Q--	--S---	-----Y-	H-R-----	---R---	-----
Mutant54	-----	--Q---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant55	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----L-----
Mutant56	----Q--	--S---	-----Y-	F-R-----	---R---	-----
Mutant57	-----	-ME---	-----Y-	Q-R-----	---R---	-----
Mutant58	-----	-ME---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant59	----Q--	--H---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant60	-----	-F----	-----H-	--E-----	---H---	----HY-----
Mutant61	-----	--E---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant62	-----	-ME---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant63	-----	--E---	-----Y-	Q-R-----	---R---	-----
Mutant64	-----	--E---	-----Y-	V-R-----	---R---	-----
Mutant65	-----	--H---	-----Y-	M-R-----	---R---	-----
Mutant66	-----	-W----	-----H-	--E-----	---H---	----LY-----
Mutant67	-----	--H---	-----Y-	W-R-----	---R---	-----
Mutant68	-----	--M---	-----Y-	F-R-Y-----	---R---	-----
Mutant69	-----	-L-T--	--R-----L-	I-----L----	-----	-----
Mutant70	-----	-W----	-----H-	--F-----	---H---	----LY-----
Mutant71	-----	-W----	-----H-	--N-----	---H---	----LY-----

Tabla D. Secuencias de CDR de los bucles de candidatos originales/conjuntos de sustituciones

Ejemplo 18

Determinación de la estabilidad coloidal por el punto de acumulación de proteínas utilizando dispersión dinámica de la luz

Para determinar la temperatura de acumulación de las muestras en estudio mediante dispersión dinámica de la luz, se obtuvo la dependencia del tamaño de partícula en el medio a temperatura utilizando DynaPro® Plate Reader II (Wyatt Technology Corp.) con calentamiento gradual de 40 a 85°C. Los resultados se muestran en la Tabla E. La Fig. 21 y la Fig. 22 muestran

los perfiles de curvas de agregación para el anticuerpo examinado en 20mM Acetato, pH=5.0 y 20mM citrato, pH=5.0 soluciones

Muestras del Ensayo		Punto de Acumulación
BCD-133	20mM Acetato, pH=5,0	66,4°C $\pm$ 0,5°C
	20mM Cit, pH=5,0	65,1°C $\pm$ 0,5°C

Tabla E. Punto de acumulación de BCD-133

Se puede concluir que la molécula BCD-133 tiene una alta estabilidad termo-coloide (el punto de acumulación en acetato de 20 mM, pH = 5.0 y Cit de 20 mM, pH = 5.0 soluciones también es $> 65^{\circ}$).

Ejemplo 19

Determinación de la estabilidad térmica bajo estrés térmico a 50°C

Las muestras del ensayo se colocaron en un baño de aire termostatzado y se termostatzaron a 50°C durante 72 horas. Después del calentamiento, las muestras intactas y estresadas se analizaron mediante HPLC de exclusión por tamaño (SEC HPLC) con un detector de UV y mediante electroforesis en condiciones no reductoras. Se realizó cromatografía en el sistema de HPLC Agilent 1100 en la columna Tosoh TSK-Gel G3000SWXL, y la detección se realizó a una longitud de onda de 220 nm. La electroforesis se realizó en Caliper Labchip GX II. La preparación de las soluciones de trabajo y la preparación de un chip se realizaron de acuerdo con el procedimiento estándar utilizando el kit de reactivos HT Protein Express.

Los datos resultantes sobre la estabilidad de BCD-133 cuando se incubaron a 50°C se muestran en la Tabla F, la Fig. 23,24 muestra cromatogramas combinados: azul - intacto; Rojo - 72 horas de incubación a 50°C.

Solución de Tampón	Condiciones de las muestras del Ensayo	GF HPLC			EP
		Contenido acumulado, %	Contenido de Monómeros, %	Contenido de Frangmentos, %	Fracción Principal, %
20mM Acetate, pH=5,0	Control de input	1,09	97,37	1,54	88,4
	72 h at 50°C	1,54	96,59	1,87	87,6

	Δ^*	0,45	-0,78	0,33	-0,8
20mM Cit, pH=5,0	Control de input	1,429	97,281	1,289	91,3
	72 h at 50°C	1,79	96,03	2,179	89,7
	Δ^*	0,361	-1,251	0,89	-1,6

* Δ es la diferencia entre la pureza de una muestra estresada y la pureza de una muestra intacta (control de entrada),%.

Tabla F. Dependencia del contenido de monómeros por HPLC de exclusión por tamaño y electroforesis para BCD-133.

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente a IL-5R α , en donde dicho anticuerpo monoclonal comprende:

1) un dominio variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a la secuencia de la SEC. ID NO: 3;

1) un dominio variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a la secuencia de la SEC. ID NO: 8.

2. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO: 3.

3. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID NO: 8.

4. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 1-3.

5. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID NOs: 1-3.

6. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 6-8.

7. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEC. ID NOs: 6-8.

8 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

1) el dominio variable de la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 1-3;

2) el dominio variable de la cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos que son al menos 80% homólogas a las secuencias de las SEC. ID NOs: 6-8.

9 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que

1) El dominio variable de la cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos de las SEQ. ID NOs: 1-3;

2) El dominio variable de la cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos de las SEQ. ID NOs: 6-8.

10 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5.

11 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5.

12 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

13 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

14 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde

1) el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5;

2) el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

15 Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que

1) el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 4-5;

2) el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 9-10.

16 . Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende:

1) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 11-12;

2) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% homóloga a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC ID NOs: 13-14.

17. Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la Reivindicación 16, que comprende:

1) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 11-12;

2) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 13-14.

18 Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la Reivindicación 1, en donde el anticuerpo específico para IL-5R α es un anticuerpo IgG completo.

- 19 Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la Reivindicación 18, en donde el anticuerpo IgG completo es de isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 20 Un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la Reivindicación 19, en donde el anticuerpo IgG completo es de isotipo IgG1 humano.
- 21 Un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20.
- 22 Un ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 21, en donde el ácido nucleico es DNA.
- 23 Un ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 21, que comprende:
- a) una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 y que es al menos 90% homóloga a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 15-16, y / o una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1 y que es al menos 90% homóloga a una secuencia seleccionada de un grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17-18; o
 - b) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 15-16, dicha secuencia de nucleótidos codifica la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1, y/o una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que comprende las SEC. ID NOs: 17-18, dicha secuencia de nucleótidos codifica la cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1.
24. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las Reivindicaciones 21-23.
25. Un método para producir una célula huésped para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende la transformación de una célula con un vector de acuerdo con la reivindicación 24.
26. Una célula huésped para preparar un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, comprendiendo dicha célula huésped un ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21-23.

27. Un método para preparar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que comprende el cultivo de una célula huésped según la reivindicación 26 en un medio de crecimiento en condiciones suficientes para producir dicho anticuerpo, si es necesario, seguido de aislamiento y purificación del anticuerpo obtenido.

28. Una composición farmacéutica destinada a usarse para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , comprendiendo dicha composición farmacéutica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

29. Una composición farmacéutica según la reivindicación 28, destinada a usarse para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , seleccionándose dicha enfermedad o trastorno del grupo que comprende: asma, por ejemplo, asma eosinófilica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinófilica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinófilica; gastroenteritis eosinófilica.

30. Una combinación farmacéutica destinada a usarse para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , comprendiendo dicha combinación farmacéutica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, y al menos un compuesto diferente terapéuticamente activo.

31. Una combinación farmacéutica según la reivindicación 30, destinada a usarse para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno mediado por IL-5R α , seleccionándose dicha enfermedad o trastorno del grupo que comprende: asma, por ejemplo, asma eosinófilica (asma atópica), por ejemplo, asma eosinófilica grave (asma atópica); EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de Churg-Strauss; esofagitis eosinófilica; gastroenteritis eosinófilica.

32. Una combinación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30-31, en la que los diferentes compuestos terapéuticamente activos son seleccionados de una molécula pequeña, anticuerpo u hormonas esteroides, como los corticosteroides.

Resumen

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología y proporciona anticuerpos que se unen específicamente a IL-5R α . La invención también se refiere a la codificación DNA de dichos anticuerpos, los correspondientes vectores de expresión y a métodos de producción de los mismos, como así también a métodos para tratamiento que usan dichos anticuerpos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SOCIEDAD ANÓNIMA "BIOCAD"

<120> ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI IL-5Ra

<140> RU2017134413

<141> 2017-10-03

<160> 18

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 1

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 2

Ala Ile Asn Ser Gly Gly Lys Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 3

Asp Tyr Ala Thr Asn Tyr Gly Val Pro Tyr Phe Gly Ser

1 5 10

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 4

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Lys Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asp Tyr Ala Thr Asn Tyr Gly Val Pro Tyr Phe Gly Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 5

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 5

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ser Gly Gly Lys Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Asp Tyr Ala Thr Asn Tyr Gly Val Pro Tyr Phe Gly Ser Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 6

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Gly Tyr Asp Val His

1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 7

Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 8

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly His Val Val

1 5 10

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 9

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

35 40 45

Leu Ile Phe Asp Asp Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

	85	90	95
Leu	Ser	Gly	His Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100	105	110	

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 10

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

<210> 11

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 11

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

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

<210> 12

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 12

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

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

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly Lys

450

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 13

Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

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

<210> 14

<211> 219

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<400> 14

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

<210> 15

<211> 1353

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<400> 15

caagtaaccc taaaggaaag tggaggagga cttgtccaac ccggcggcag ttttaagactt 60

agctgtgctg cttctggctt tacttttagc aactatgcta tgtcgtgggt gcgtcaagcg 120

ccaggaaagg gcctagaatg ggtgagcgct atcaatagcg gcggaaaaag cactaactac 180

gcggacagcg tgaaaggccg cttcactata agtcgggaca atgctaaaaa cacactgtac 240

ctccagatga actccctaag agctgaggac acggctgtgt actactgcgc tgattatgcg 300

actaactatg gagtgccata cttcggaagc tggggccagg gaacgaccgt aactgtgagt 360

agtgctagca ccaagggccc atcggctctc ccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660

cccaaatttt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720

ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa ccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840

tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgaggag 1080

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140

atgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320

acgcagaaaa gcctctccct gtccccgggt aaa 1353

<210> 16

<211> 1353

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<400> 16

caagtacaac tacaggaaag tggaggagga cttgtccaac ccggcggcag tttaagactt 60

agctgtgctg cttctggctt tacttttagc aactatgcta tgcgtgggt gcgtcaagcg 120

ccaggaaagg gcctagaatg ggtgagcgt atcaatagcg gcggaaaaag cactaactac 180

gcggacagcg tgaaggccg cttcactata agtcgggaca atgctaaaaa cacactgtac 240

ctccagatga actccctaag agctgaggac acggctgtgt actactgcgc tgattatgcg 300

actaactatg gagtgcata cttcggaagc tggggccagg gaacgatggt aactgtgagt 360

agtgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggc aaggactact tcccgaacc ggtgacggg 480
 tcgtggaact caggcgcct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtggg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtag 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gcctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag 1080
 gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgttca aaggcttcta tcccagcag 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgttgact ccgacggctc cttcttctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ccatgtctc gtgatgatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaaa gcctctcct gtccccggg aaa

<210> 17

<211> 657

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<400> 17

caggctggac tgacgcaacc gccatctgtg agtgcggctc caggacaacg ggtgactata 60

agctgcagcg gaagcagaag caacataggc agtggatacg acgtacattg gtaccaacaa 120

gtaccgggga cggctccgaa actactgata ttgacgata ataatagacc gagcggcgta 180

ccagaccgtt ttagcggaag caaaagtga acgagtcct ctttagccat aactggcctg 240

caagctgaag atgaagctga ttattactgt cagagctacg acagcagtct gaggggacac 300

gtagtgtttg gaggaggaac gaagctgacg gtattacgta cgggtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttc cgccatctga tgagcagtg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtga aggtggataa cgccctcaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600

gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

<210> 18

<211> 657

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<400> 18

cagagtgtgc tgacgcaacc gccatctgtg agtgcggctc caggacaacg ggtgactata 60

agctgcagcg gaagcagaag caacataggc agtggatacg acgtacattg gtaccaacaa 120

ctaccgggga cggctccgaa actactgata tacgacgata ataatagacc gagcggcgta 180

ccagaccgtt ttagcggaag caaaagtga acgagtcct ctttagccat aactggcctg 240

caagctgaag atgaagctga ttattactgt cagagctacg acagcagtct gaggggacac 300

gtagtgttg gaggaggaac gaagctgacg gtattacgta cggtaggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagtg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa 480

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600

gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 657

DIBUJOS

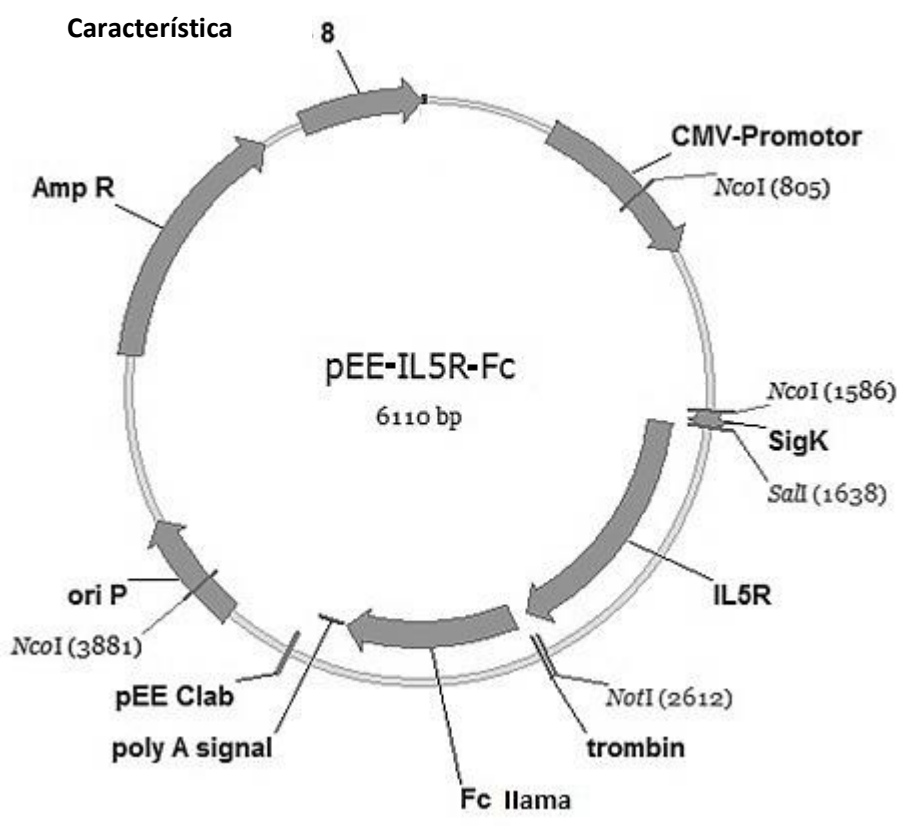


Fig. 1

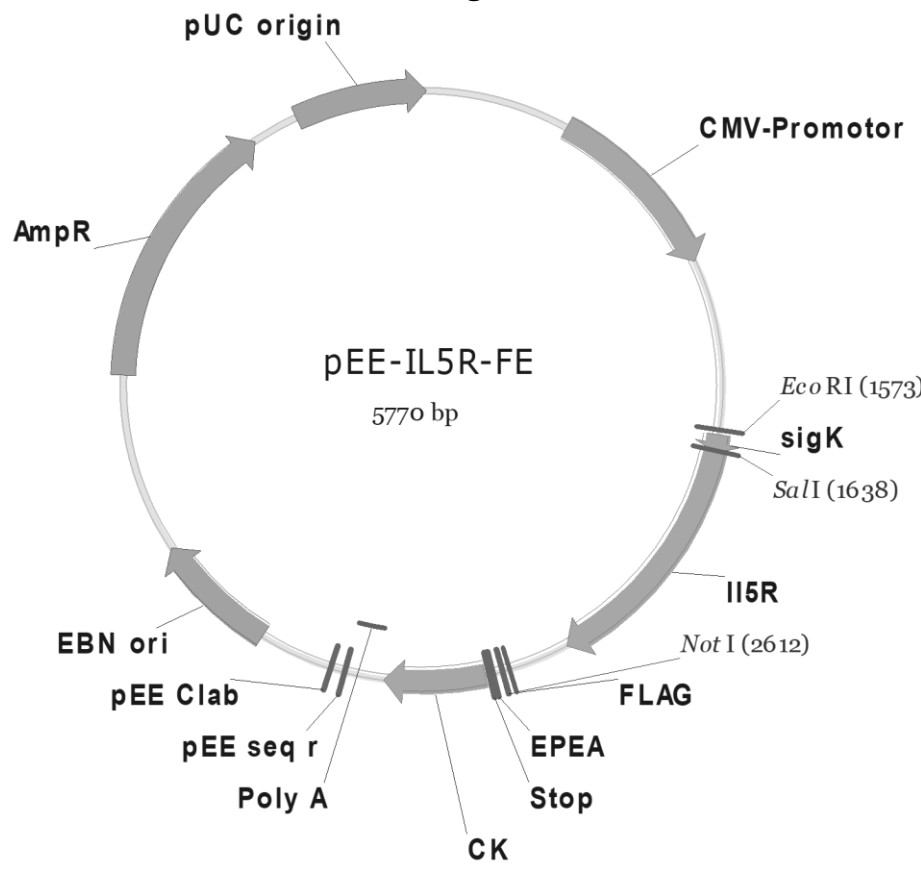


Fig. 2

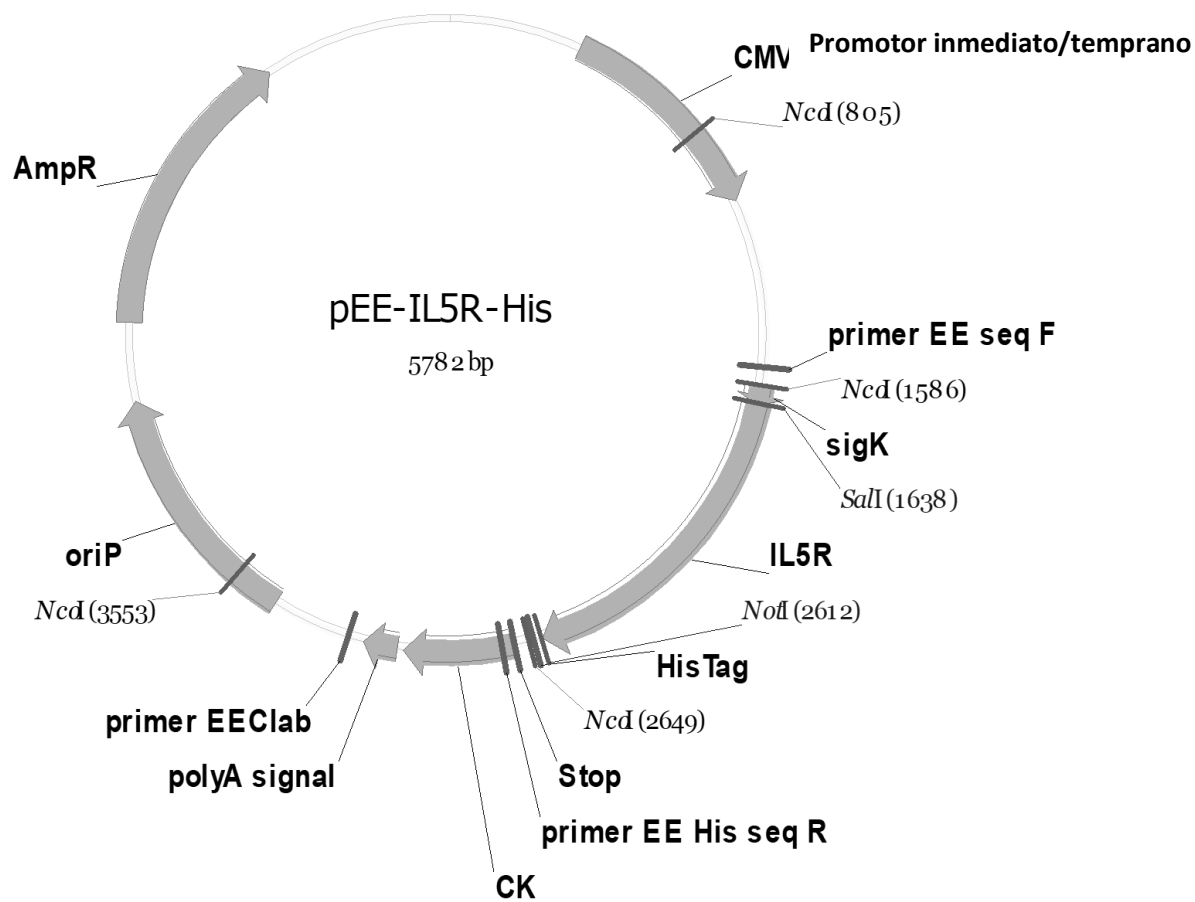


Fig.3

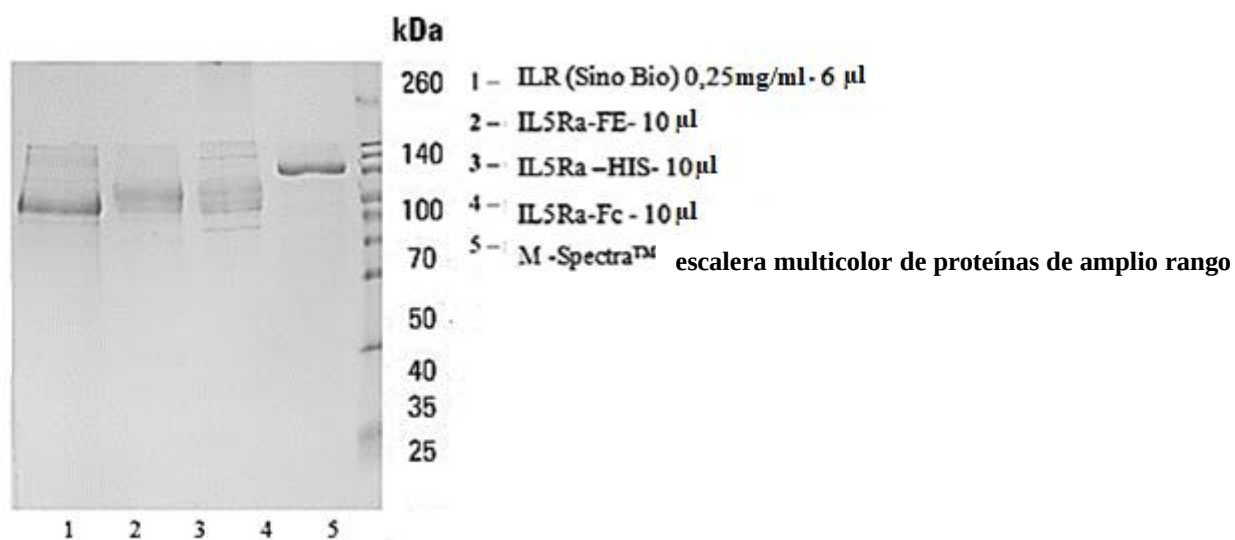


Fig. 4

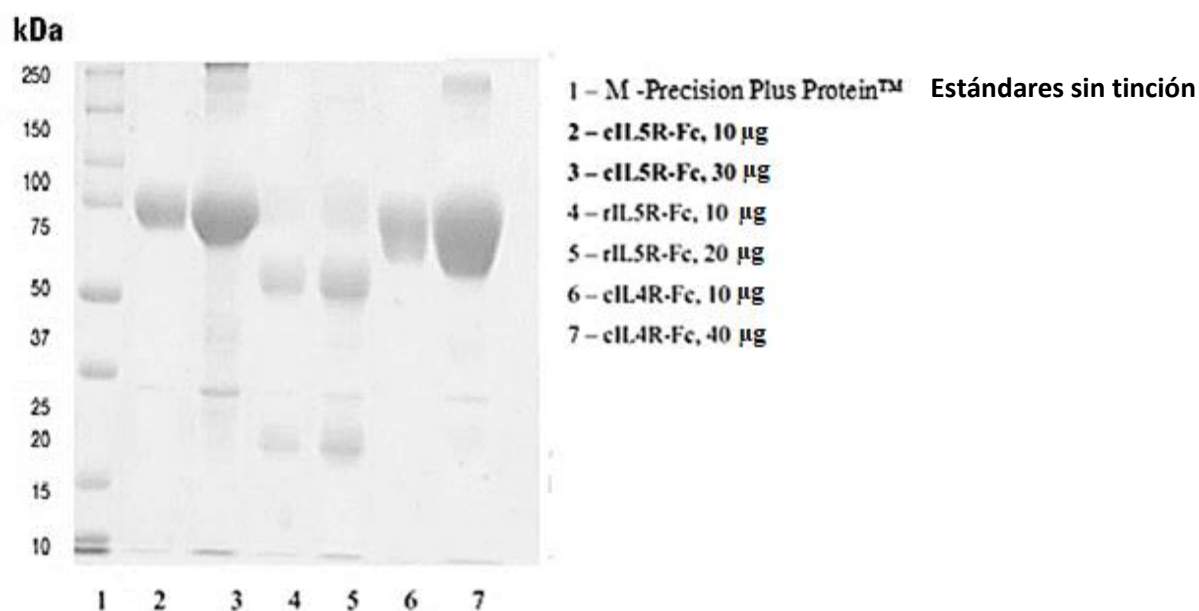


Fig.5

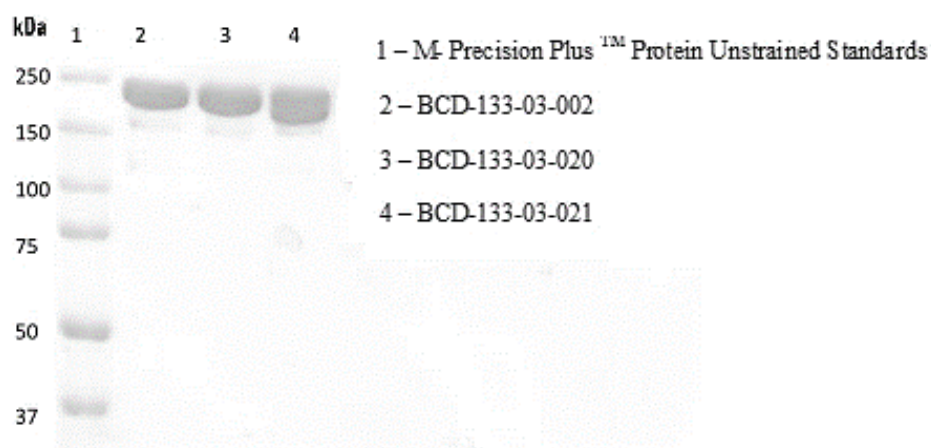


Fig.6

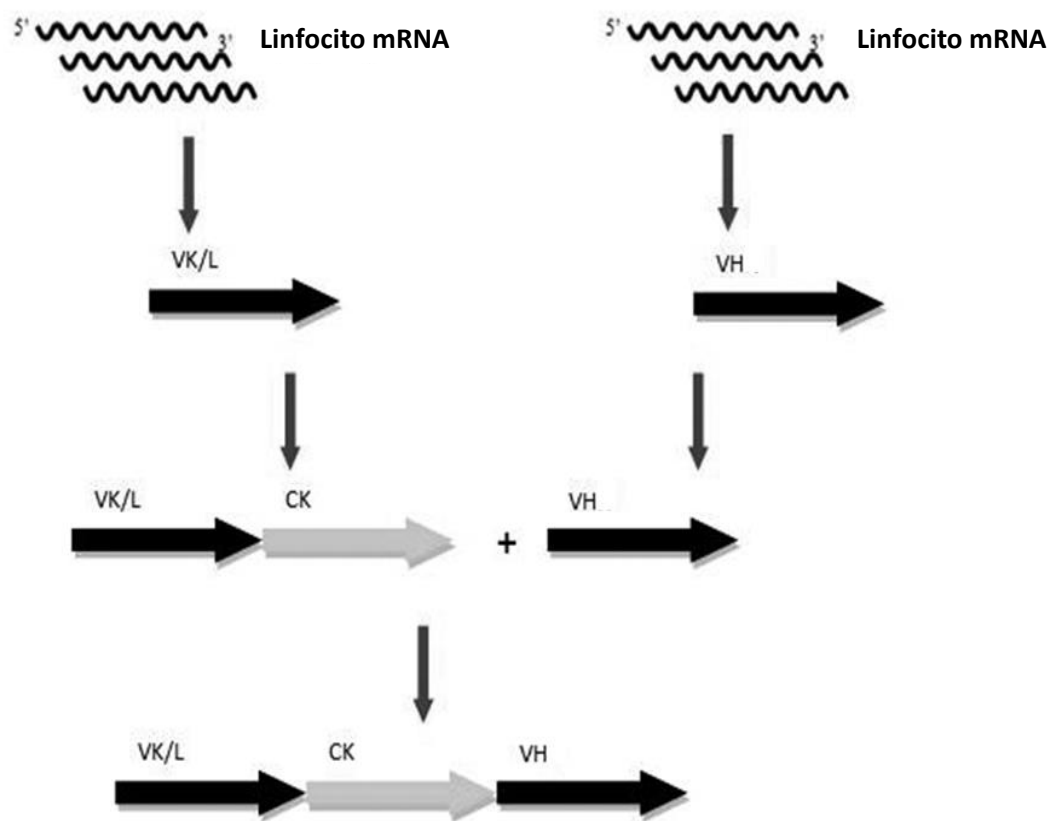


Fig. 7

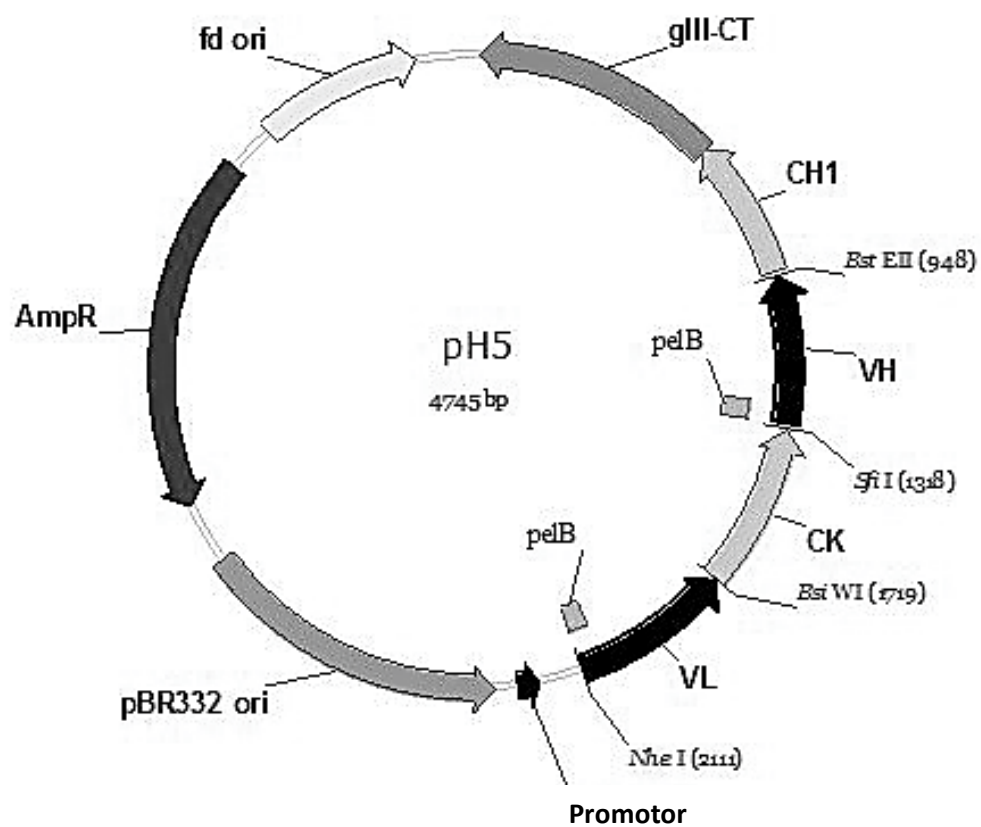


Fig. 8

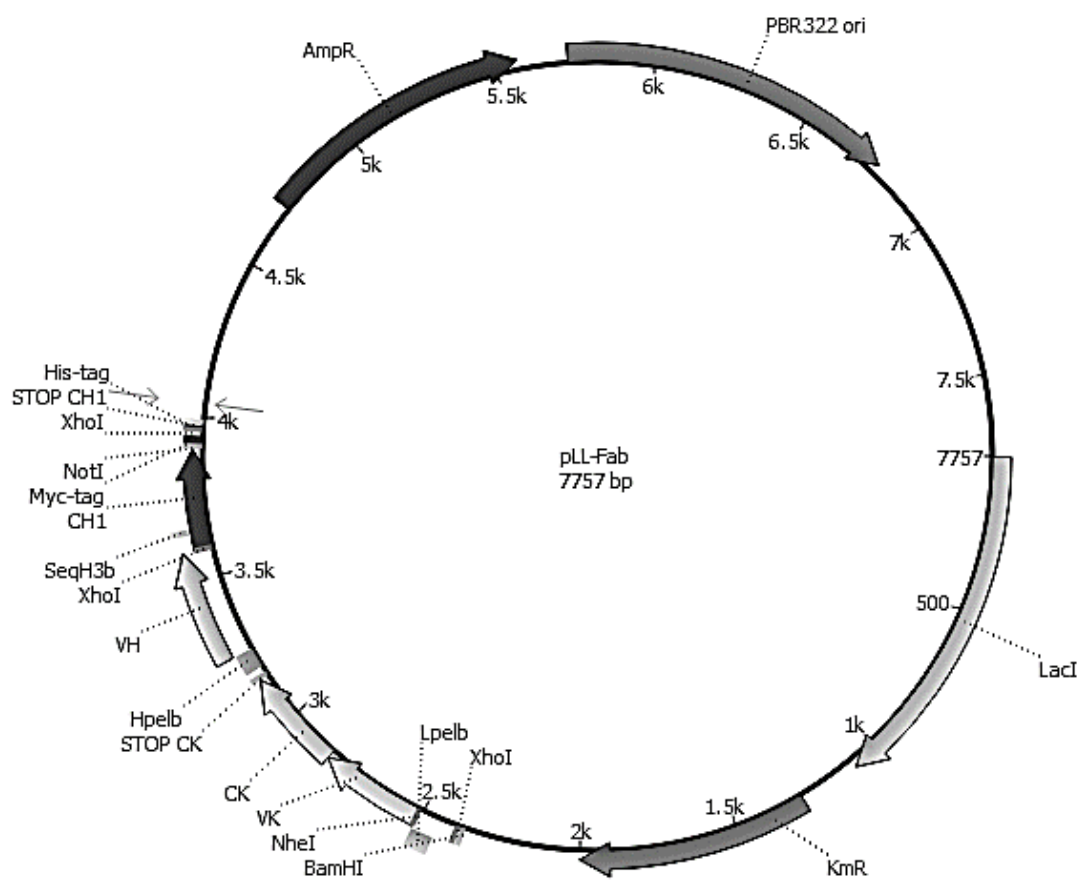


Fig. 9

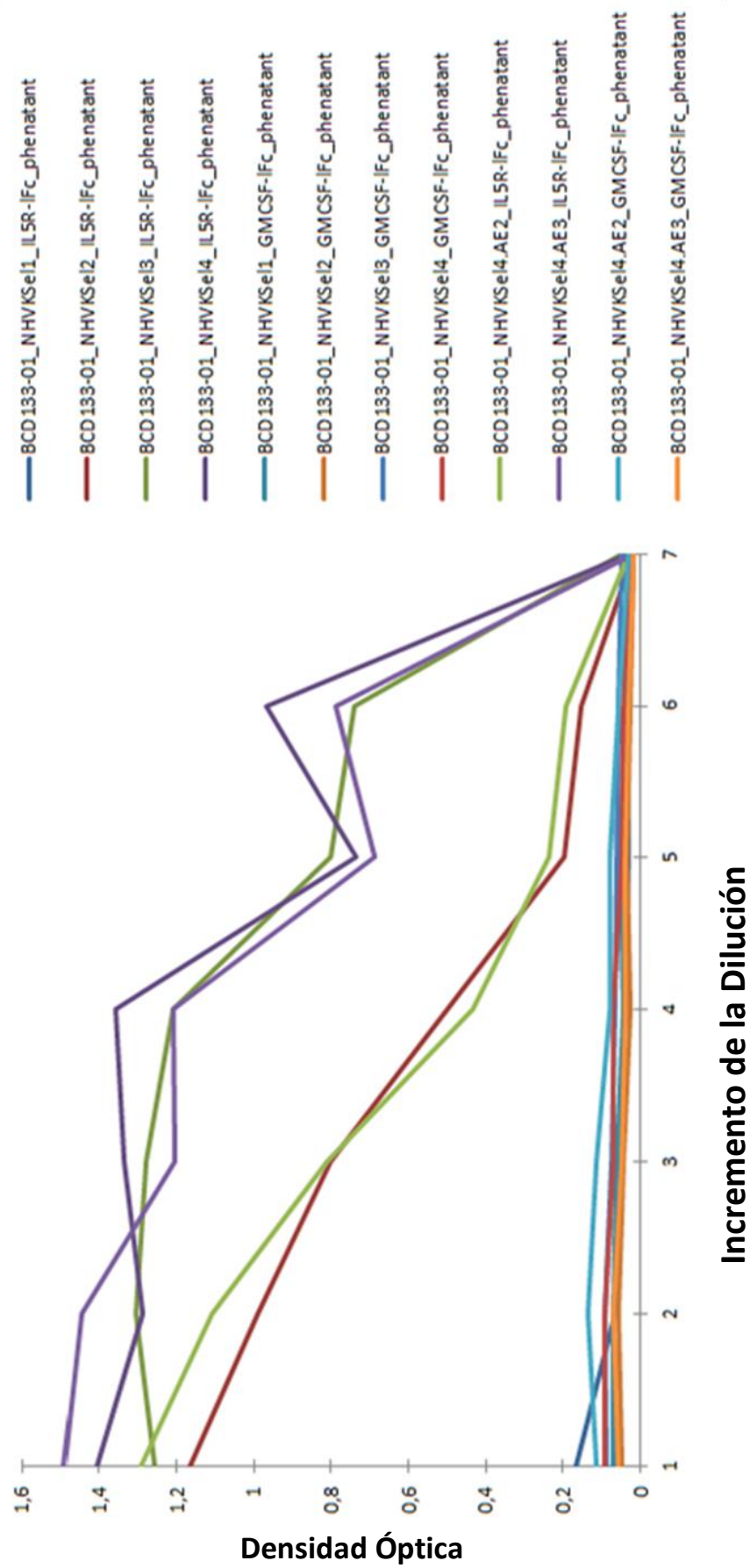


Fig. 10

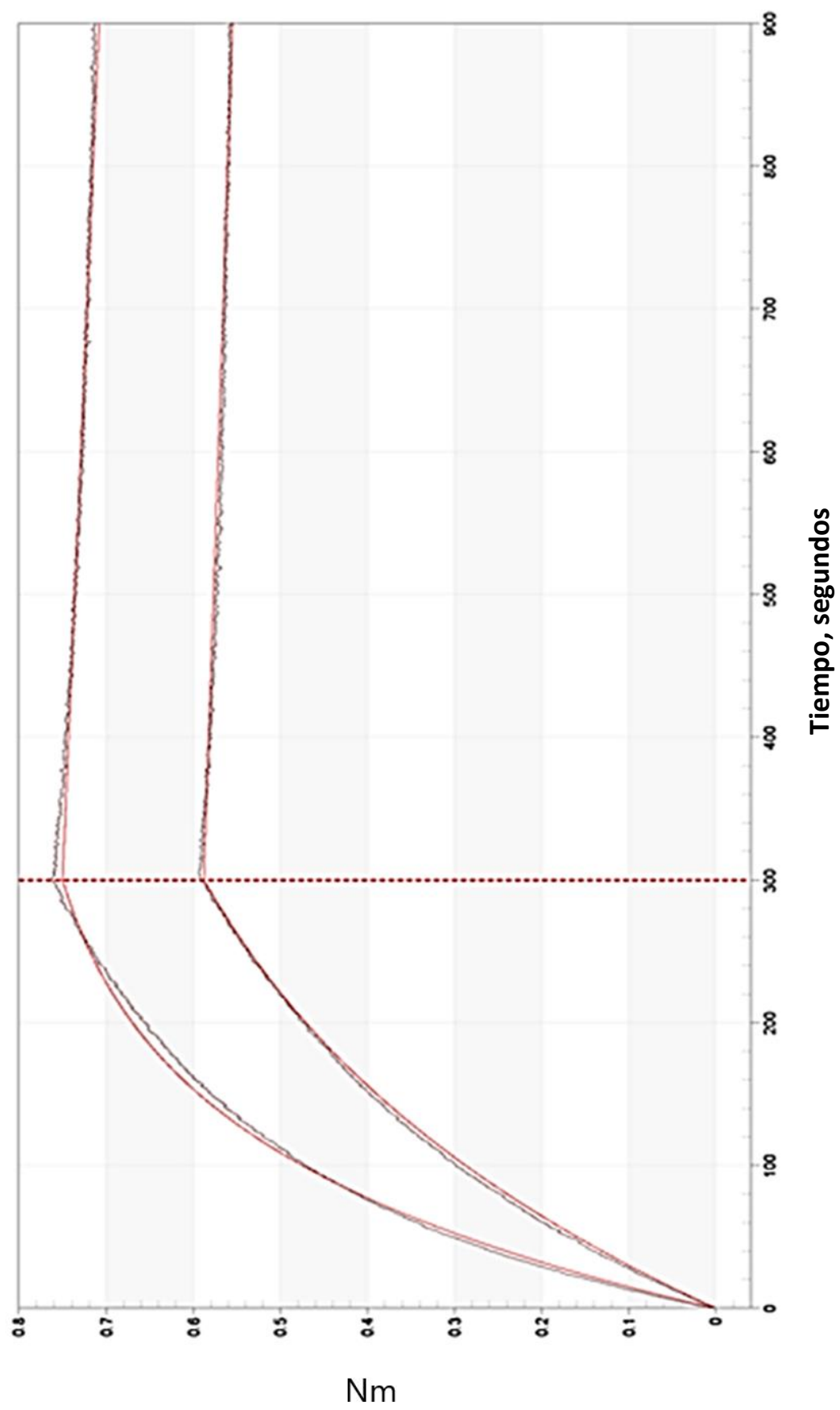


Fig. 11

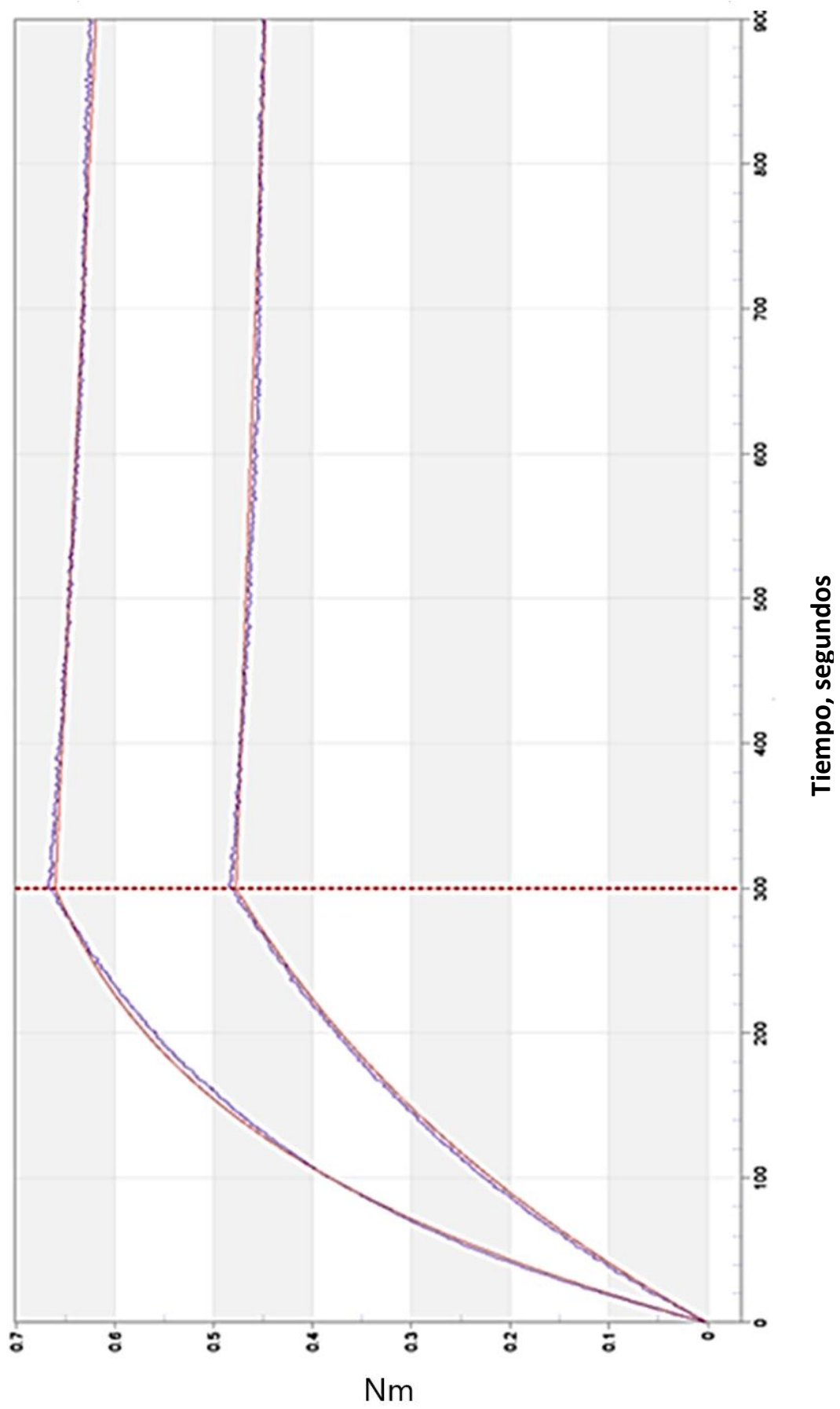


Fig. 12

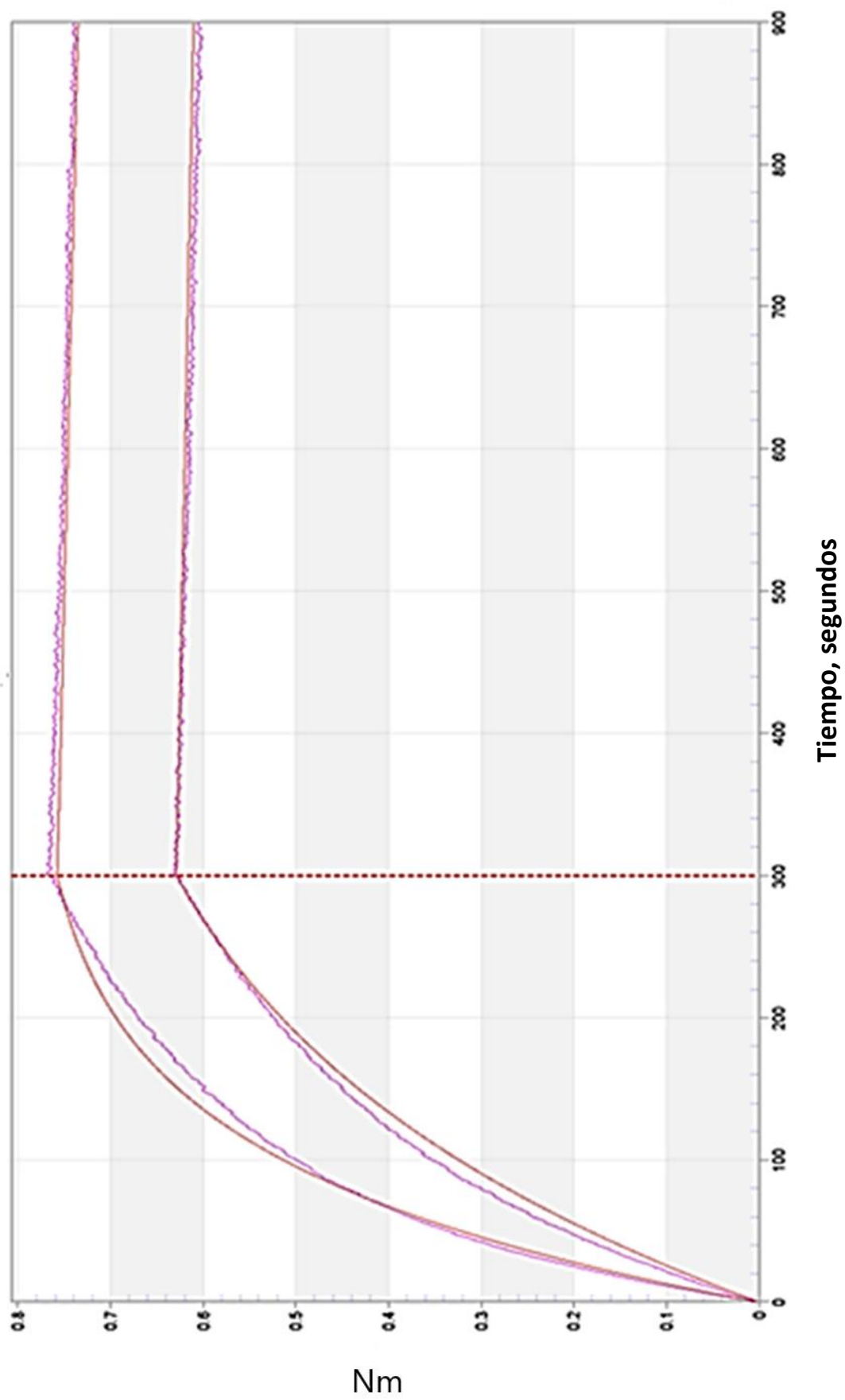


Fig. 13

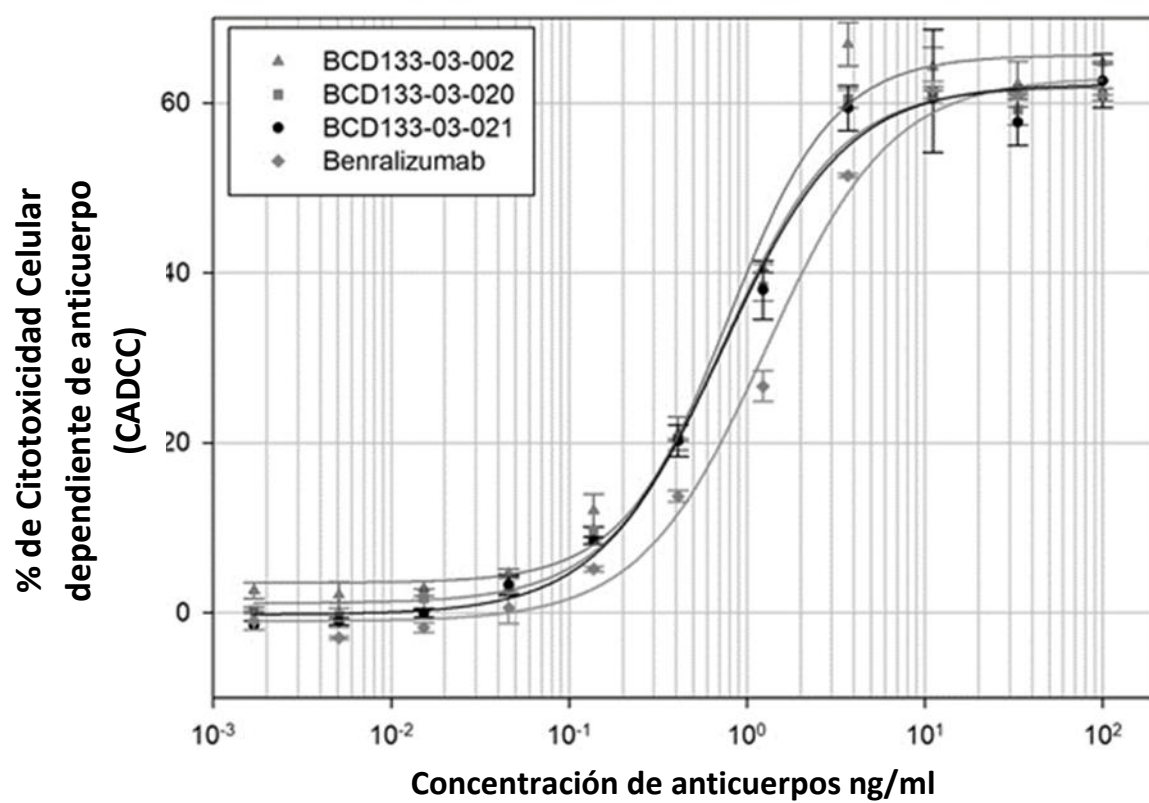


Fig. 14

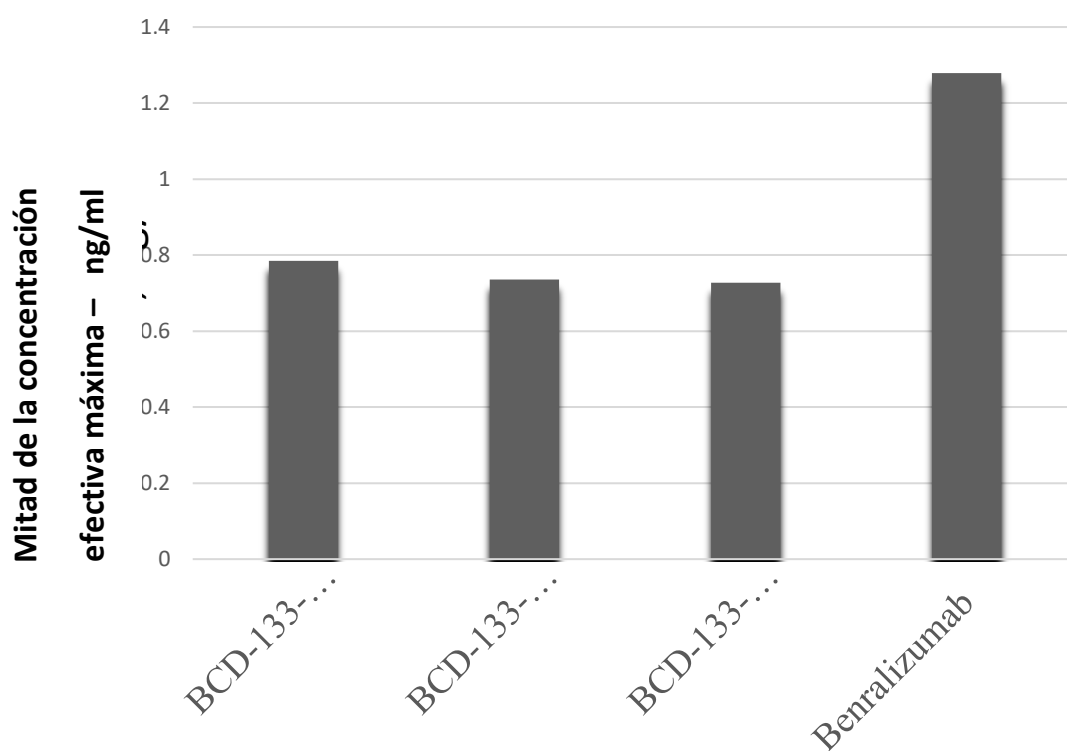


Fig. 15

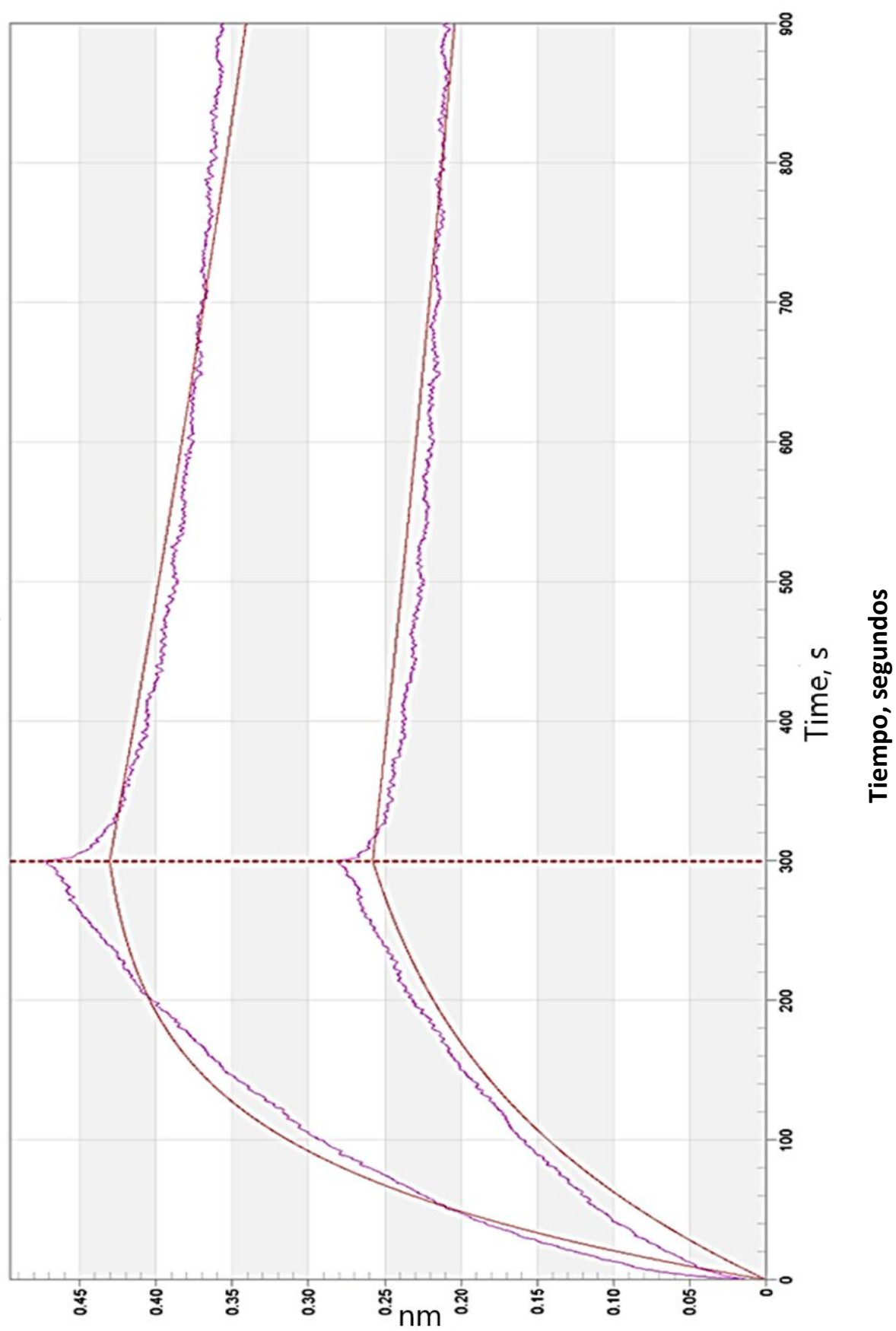


Fig. 16

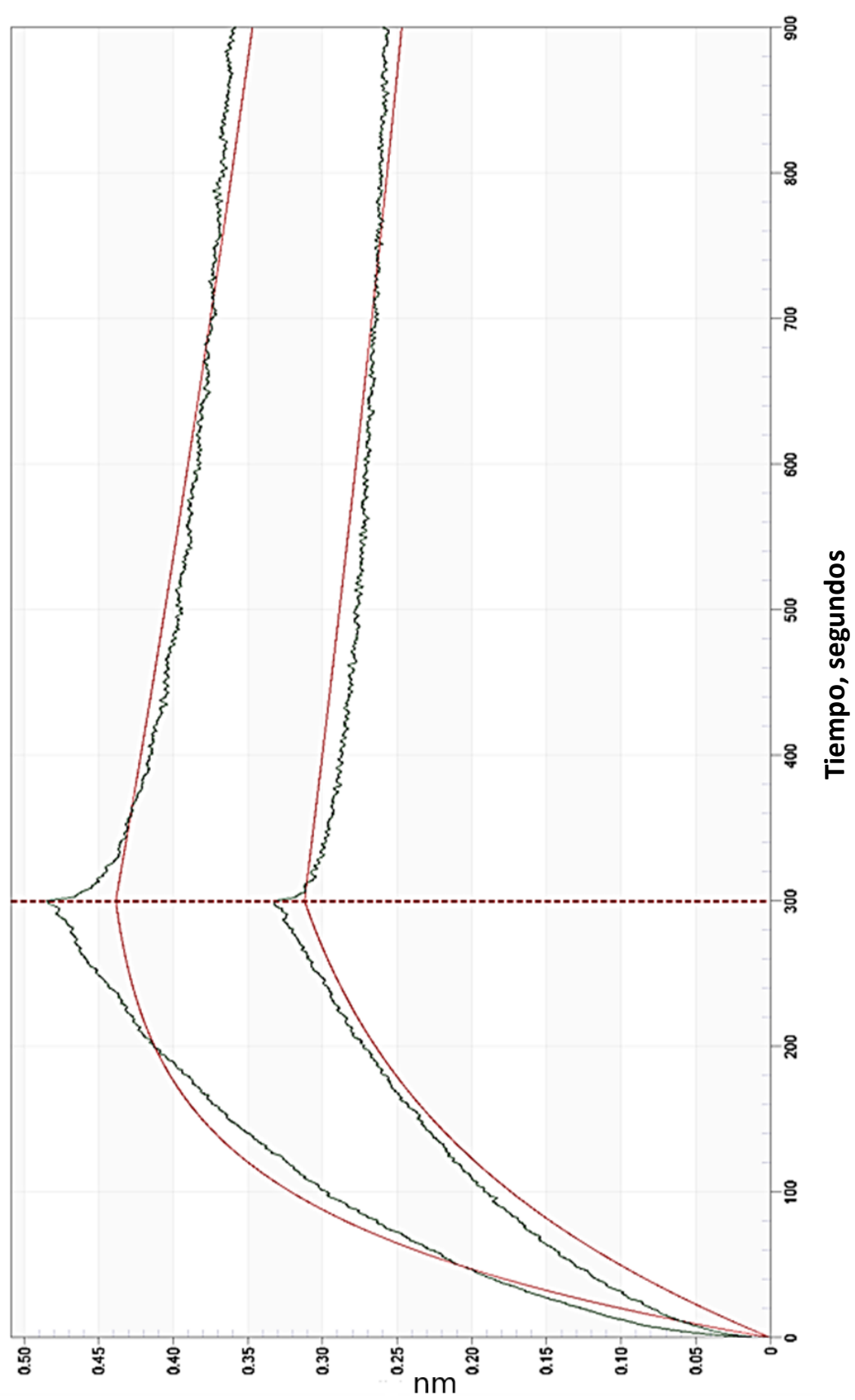


Fig. 17

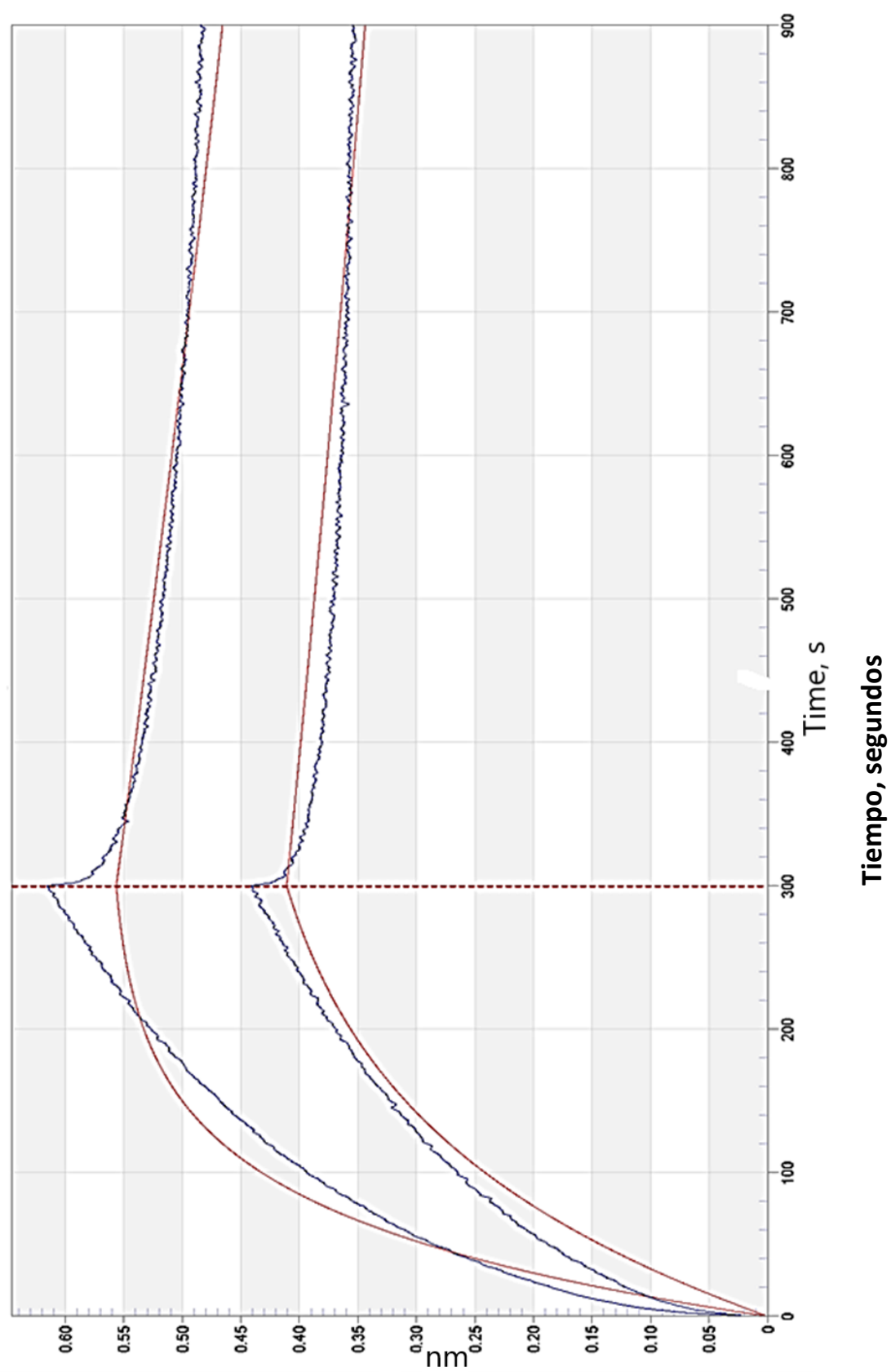


Fig. 18



Fig. 19

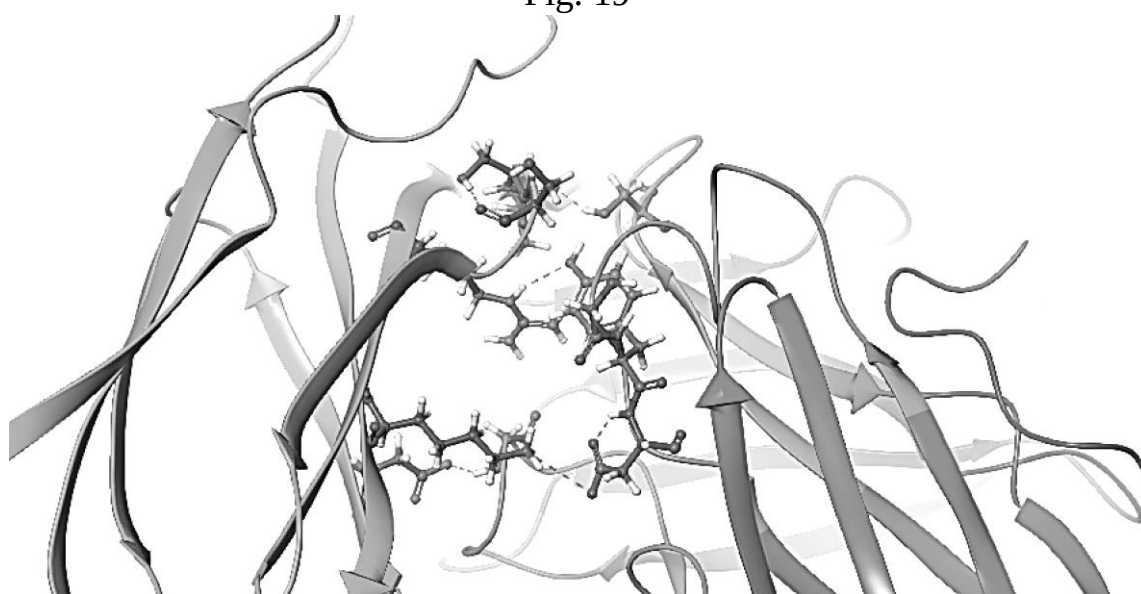


Fig. 20

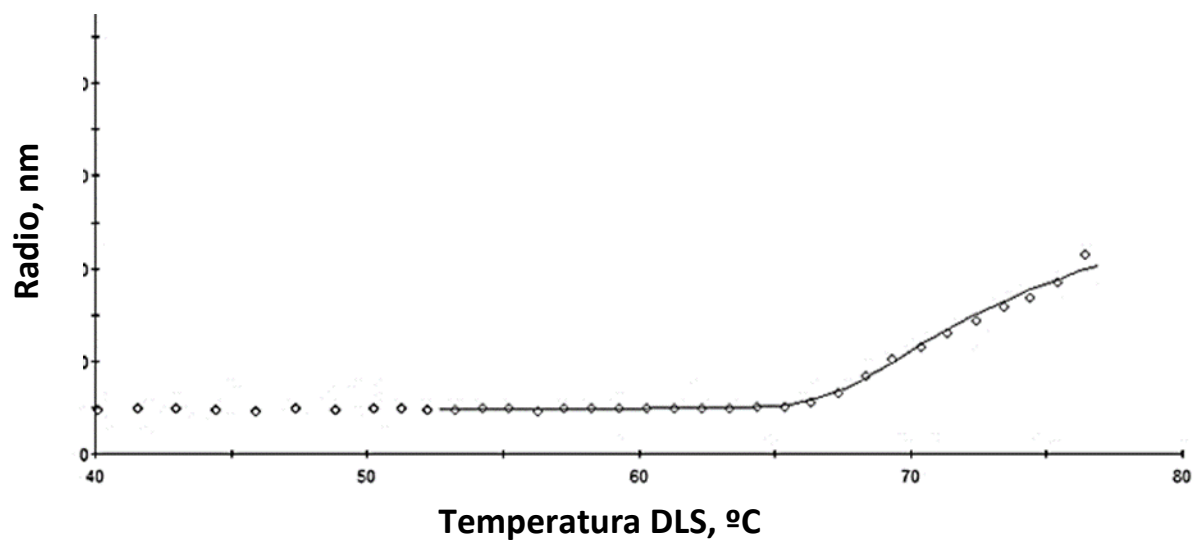


Fig.21

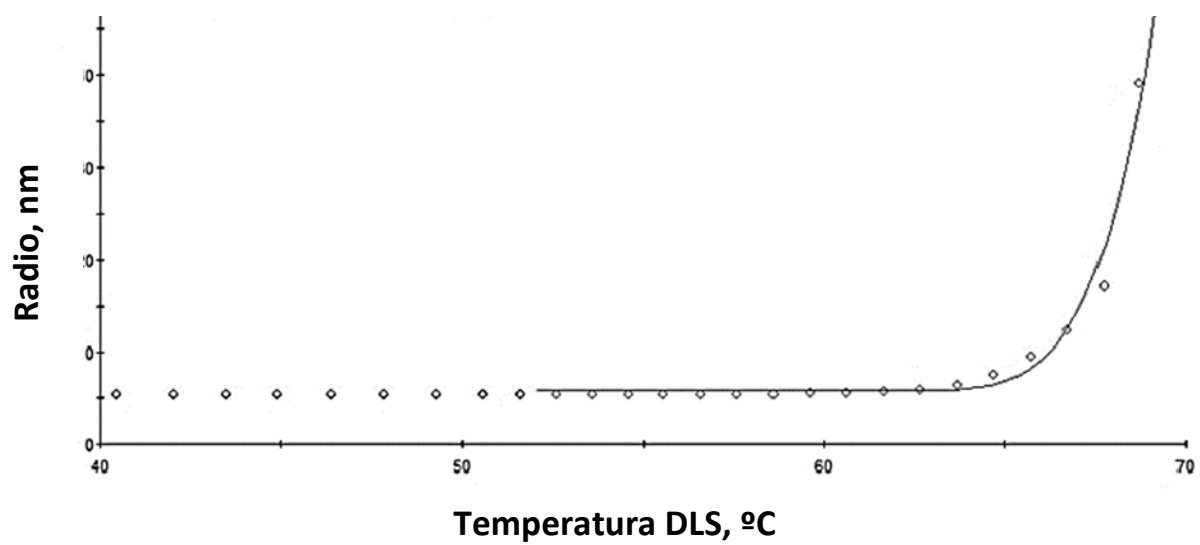


Fig.22

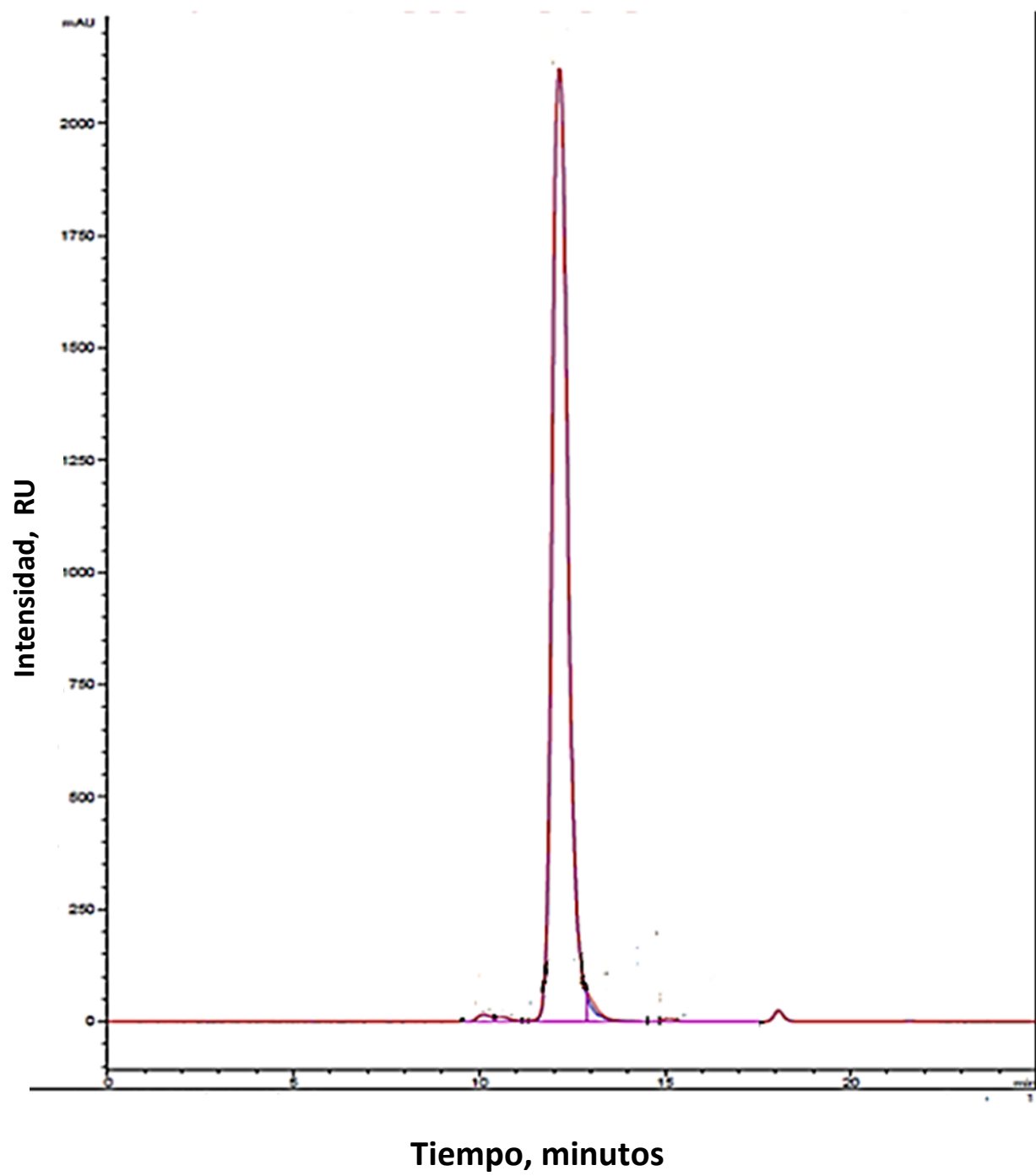


Fig.23

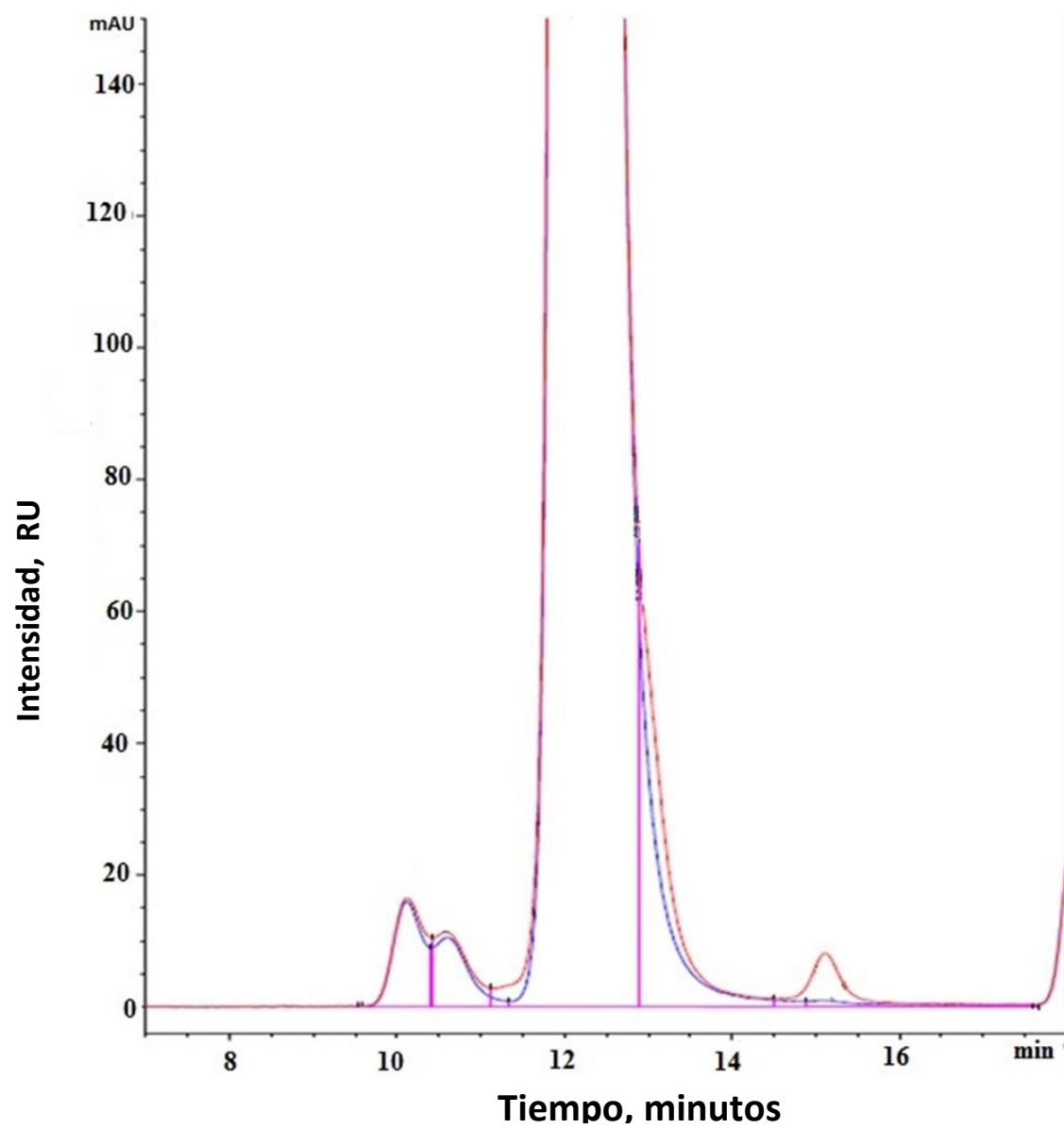


Fig.24