

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 303**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/42** (2006.01)

**A61P 37/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2015 PCT/US2015/035981**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2015 WO15195631**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015 E 15810347 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3157951**

54 Título: **Anticuerpos anti-IGE humanizados que entrecruzan CD23 en linfocitos B pero no sensibilizan los mastocitos**

30 Prioridad:

**17.06.2014 US 201462013196 P**

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

**11.03.2021**

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)  
128, Academia Road, Section 2  
Nankang, Taipei 115, TW**

72 Inventor/es:

**CHEN, JIUN-BO;  
SHIUNG, YU-YU y  
CHANG, TSE-WEN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 811 303 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IgE humanizados que entrecruzan CD23 en linfocitos B pero no sensibilizan los mastocitos

## 5 Antecedentes de la invención

## 1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la preparación de anticuerpos humanizados que son capaces de unirse a IgE libre, a IgE unida a la membrana en linfocitos B, a IgE unida por CD23, pero no a la IgE unida por los receptores IgE.Fc de alta afinidad en los mastocitos. La invención también se refiere a las aplicaciones terapéuticas de dichos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE, incluyendo asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria, urticaria (idiopática) espontánea crónica, rinosinusitis crónica, mastocitosis sistémica, mastocitosis cutánea, aspergilosis broncopulmonar alérgica, angioedema idiopático recurrente y trastorno gastrointestinal asociado con los eosinófilos.

## 2. Descripción de la técnica relacionada

20 La alergia es un estado hipersensible inducido por una respuesta inmunitaria exagerada a un antígeno inofensivo foráneo. Se produce una respuesta de hipersensibilidad inmediata a través de la interacción de la inmunoglobulina E (IgE) y del receptor de IgE.Fc de alta afinidad (FcεRI) presente en la superficie de los mastocitos y basófilos en presencia de alérgenos capaces de reaccionar con la IgE unida a FcεRI, causando la liberación de mediadores realizados y recién sintetizados a partir de estas células inflamatorias. La mayoría de las enfermedades alérgicas están mediadas por la IgE. Es bien sabido que una serie de enfermedades no alérgicas, que no implican una respuesta inmunitaria a un antígeno foráneo, particularmente, enfermedades inflamatorias de la piel, también están mediadas por la IgE.

30 Hay dos receptores principales para la IgE, FcεRI y el receptor de IgE.Fc de baja afinidad FcεRII (también denominado CD23). FcεRI se expresa predominantemente en la superficie de los mastocitos y basófilos en los seres humanos, donde es un complejo tetramérico que consiste en una cadena α, una cadena β y dos cadenas γ unidas por disulfuro. La activación de FcεRI en los mastocitos y basófilos por alérgenos conduce a la desgranulación, mientras que la activación de FcεRI en las células dendríticas conduce a la presentación de alérgenos mediada por IgE.

35 CD23 es una glicoproteína transmembrana de tipo II de aproximadamente 45 kDa de peso molecular que comprende un dominio similar a la lectina de tipo C, seguido de una región de tallo, que porta varias repeticiones que sirven como una supuesta cremallera de leucina para formar recortadores superenrollados, una sola región que abarca la membrana y un dominio citoplasmático N-terminal corto. De hecho, la afinidad de la CD23 monomérica hacia IgE ( $KD = 10^{-6}$ - $10^{-7}$  M) es mucho menor que la de FcεRI ( $KD =$  aproximadamente  $10^{-10}$  M), pero aumenta sustancialmente en su forma trimérica ( $KD = 10^{-8}$ - $10^{-9}$  M). El gen FCER2 que codifica el polipéptido CD23 posee 2 sitios de inicio de la transcripción alternativos que conducen la síntesis de dos variantes de ARNm que conducen a producir dos isoformas CD23 que difieren en los primeros siete (CD23a) y seis (CD23b) aminoácidos de la cola citoplasmática N-terminal. CD23a es expresada exclusiva y contiguamente por los linfocitos B, mientras que CD23b es inducida por IL-4 en la superficie de monocitos/macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, eosinófilos, células dendríticas y células epiteliales. Se cree que CD23 en los linfocitos B contribuye a la regulación de la producción de IgE y la presentación del antígeno, mientras que CD23 en macrófagos y células dendríticas participa en la fagocitosis/endocitosis, el aclaramiento del complejo antígeno-IgE y la presentación del antígeno. La función adicional de CD23 en las células epiteliales incluye el transporte de IgE. El complejo antígeno-IgE penetra directamente a través del epitelio hasta el espacio de la luz y viceversa. CD23 también se puede liberar de las superficies celulares como un intervalo de proteínas CD23 solubles libres (sCD23) de 37, 33, 25 y 16 kDa. La metaloproteasa predominante responsable del desprendimiento de CD23 *in vivo* es el gen ADAM10, que genera especies de sCD23 de 37 kDa o 35 kDa en una forma trimérica. Otra sCD23 natural es derCD23 producida por la acción de la proteasa Der p1 que se encuentra en las heces del ácaro del polvo doméstico, *dermatophagoides pteronyssinus*. La escisión de CD23 por Der p1 produce derCD23 monomérica de 16 kDa. Se muestra que se observó que los fragmentos triméricos de sCD23 son moléculas clave para potenciar la síntesis espontánea de IgE, mientras que sCD23 monomérica de menor tamaño parece regular por disminución la síntesis de IgE estimulada por IL-4.

60 IgE existe en forma secretada y en forma de membrana, lo que parece ser variantes de corte y empalme. Las regiones constantes de la cadena ε de forma secretada de IgE albergan dominios C<sub>H1</sub>-C<sub>H2</sub>-C<sub>H3</sub>-C<sub>H4</sub>, mientras que la cadena ε de la forma de IgE unida a la membrana que tiene una IgE unida a la membrana (mIgE) se encuentra en dos isoformas como resultado de un corte y empalme alternativo en los seres humanos. La cadena ε de ambas isoformas de mIgE humana contiene un péptido de anclaje a la membrana y un péptido migis-ε. Una isoforma contiene solo el péptido migis-ε (15 aminoácidos de longitud) entre el dominio C<sub>H4</sub> y el péptido de anclaje a la membrana (denominado "forma corta"), mientras que la segunda isoforma contiene adicionalmente un dominio largo de 52 aminoácidos más (denominado dominio CεmX) entre el dominio C<sub>H4</sub> y el péptido migis-ε (denominado "forma larga").

65 Dado que la IgE desempeña un papel central en la mediación de la mayoría de las enfermedades alérgicas, se han

propuesto varias estrategias para controlar los niveles de IgE en el organismo o para regular la síntesis de IgE, tal como anti-IgE, anti-IL-4/IL-13 y anti-CD23. Omalizumab (Xolair®) es un anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado recombinante que se une a la IgE libre que circula en el suero y a la IgE unida a la membrana en los linfocitos B, pero no a la IgE unida a FcεRI y unida a CD23 en la superficie celular. Omalizumab causa una reducción significativa (de hasta el 99 %) de IgE libre en suero en pacientes alérgicos, que conduce a inhibir la unión de IgE a FcεRI y, posteriormente, una regulación por disminución de FcεRI en basófilos y mastocitos. Numerosos ensayos clínicos en muchas enfermedades mediadas por IgE, tales como asma alérgica, urticaria crónica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, etc., han demostrado que Omalizumab es eficaz y seguro en el tratamiento de estas enfermedades. Omalizumab ha sido aprobado para tratar el asma alérgica grave y la urticaria idiopática crónica en muchos países. Por otra parte, lumiliximab, que es un anticuerpo monoclonal anti-CD23 que consiste en regiones variables de primates (macaco cangrejero) y regiones constantes humanas, ha resultado unirse al dominio de lectina de tipo C evitando que la IgE se una a CD23, conduciendo así a la estabilización de CD23 superficial y a la reducción de la escisión proteolítica de CD23. Se ha informado que Lumiliximab inhibe las transcripciones de la línea germinal ε, reduce la producción de IgE de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en cultivo y reduce los niveles de IgE en sangre en pacientes alérgicos.

Las publicaciones de Belliveau (en *Medscape General Medicine*, vol. 7, n.º 1, 2005, páginas 27 - 41) y Holgate *et al.* (en *Respiratory Medicine*, vol. 103, n.º 8, 2009, páginas 1098 - 1113) enseñan que el omalizumab se une a la IgE humana libre, pero no se une a Fc-épsilon-RI en basófilos o IgE que ya está unida a Fc-épsilon-RI en basófilos o Fc-épsilon-RII en otras células (por ejemplo, linfocitos, monocitos, eosinófilos, plaquetas).

En una patente de 1990 (Patente de EE.UU. n.º 4.940.782), se desveló un anticuerpo monoclonal IgG murino 44.7b específico de la IgE de rata, que es capaz de unirse a IgE unida a CD23, pero no a IgE unida a FcεRI. Este anticuerpo 44.7b nunca tuvo un seguimiento como un candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE. Un artículo publicado en 2012 (Shiung *et al.*, *Immunobiology*, 2012, 217:676-683) informó sobre el descubrimiento de un anticuerpo monoclonal murino anti-IgE humana, 8D6, que es capaz de unirse a IgE unida a CD23, pero no a IgE unida a FcεRI. Los autores sugirieron que este anticuerpo no solo posee las principales propiedades farmacológicas del Omalizumab para neutralizar la IgE sin sensibilizar los mastocitos y los basófilos, sino también la propiedad del lumiliximab a través del entrecruzamiento de la IgE unida a CD23. Sin embargo, el anticuerpo murino puede ser inmunogénico y no puede aplicarse para tratar enfermedades mediadas por IgE. Se ha encontrado que el anticuerpo murino para aplicaciones terapéuticas en el ser humano está limitado por las respuestas inmunitarias generadas por los pacientes hacia los anticuerpos murinos. Por lo tanto, la humanización de los anticuerpos murinos es necesaria para reducir la inmunogenicidad en los receptores humanos.

## Sumario

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a (1) IgE humana en su forma libre secretada, a (2) IgE unida a la membrana en linfocitos B y a (3) IgE unida por CD23 en linfocitos B y por CD23 libre en solución. Dichos anticuerpos anti-IgE no se unen a IgE unida por FcεRI en mastocitos y basófilos y, por lo tanto, no activan esas células inflamatorias como se reivindica en la reivindicación 1. La presente divulgación también se refiere a las propiedades biológicas de esos anticuerpos anti-IgE humanizados en la biosíntesis de IgE, a la unión de IgE a distintos componentes celulares y moleculares, y a los posibles efectos de eliminación de alérgenos. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho anticuerpo humanizado como se reivindica en la reivindicación 4 y se refiere además al uso de dichos anticuerpos en el tratamiento de enfermedades alérgicas y no alérgicas mediadas por IgE como se reivindica en la reivindicación 5. Otros modos de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

Los presentes inventores han reconocido que los últimos resultados de los ensayos de fase Ib y IIa del anticuerpo anti-M1', MEMP1972A (Gauvreau *et al.*, *Science Translation Medicine*, 2014, Vol. 6: 243ra85), sugirieron que al inhibir la nueva síntesis de IgE, pueden disminuirse los síntomas mediados por IgE. También conceptualizaron que, dado que los complejos de hu8D6:IgE pueden unirse a CD23 y dado que CD23 se expresa en numerosos tipos de células (Acharya *et al. Clin. Exp. Immunol.*, 2010, 162:12-23), la absorción de los complejos de hu8D6:IgE en CD23 de la superficie celular puede reducir los niveles totales de IgE (IgE libre y unida a hu8D6) en circulación *in vivo*. Además, las células epiteliales a lo largo del revestimiento de la mucosa son capaces de eliminar sustancias unidas a las células a través de la transcitosis dependiente de CD23 (Tu *et al. "Gastroenterology"*, 2005, 129:928-940), hu8D6 puede facilitar la limpieza y eliminación de los alérgenos entrantes y los autoantígenos de unión a IgE endógenos cuando los complejos de hu8D6:IgE se transportan al espacio de la luz de los tractos gastrointestinal y broncoalveolar. Los presentes inventores también racionalizan que la unión de hu8D6 a IgE unida a CD23 puede entrecruzar eficazmente CD23 en linfocitos B, produciendo la inhibición de la producción de IgE específica del antígeno por los linfocitos B tras la activación por un antígeno específico. Esas propiedades de hu8D6 deberían respaldar la posible utilidad de que hu8D6 y otros anticuerpos humanizados con el mismo conjunto de especificidades de unión a IgE pueden inhibir la producción de IgE específica del antígeno en pacientes con enfermedades mediadas por IgE y, por lo tanto, mejorar esas enfermedades. Usando el anticuerpo 8D6 murino como ejemplo, se ha preparado una forma humanizada del anticuerpo. Este anticuerpo humanizado posee todas las propiedades de unión y biológicas mencionadas anteriormente.

## REFERENCIAS

- (1) Bonita J. Rup, Larry E. Kahn, "Monoclonal antibodies against IgE-associated determinants, hybrid cell lines producing these antibodies, and use therefore" Patente de EE.UU. n.º 4.940.782 (1990).
- (2) Yu-Yu Shiung, Chen-Yi Chiang, Jiun-Bo Chen, Pheidias C. Wu, Alfur Fu-Hsin Hung, Donic Chien-Sheng Lu, Rong-Long Pan, Tse Wen Chang. "An anti-IgE monoclonal antibody that binds to IgE on CD23 but not on high-affinity IgE.Fc receptors, FcRn", *Immunobiology.*, 217:676-683-9 (2012)
- (3) Gail M. Gauvreau, Jeffrey M. Harris, Louis-Philippe Boulet, Heleen Scheerens, J. Mark Fitzgerald, Wendy S. Putnam, Donald W. Cockcroft, Beth E. Davis, Richard Leigh, Yanan Zheng, Barbro Dahlen, Yehong Wang, Romeo Maciuga, Irvin Mayers, X. Charlene Liao, Lawren C. Wu, John G. Matthews, Paul M. O'Byrne, "Targeting membrane-expressed IgE B cell receptor with an antibody to the M1 prime epitope reduces IgE production", *Science Translation Medicine*, Vol. 6: 243ra85 (2014)
- (4) M. Acharya, G. Borland, A. L Edkins, L. M. MacLellan, J. Matheson, B. W. Ozanne y W. Cushley, "CD23/FcεRII: molecular multi-tasking", *Clin. Exp. Immunol.*, 162(1): 12-23 (2010)
- (5) Yahong Tu, Saad Salim, Jackie Bourgeois, Vincenza Di Leo, E. Jan Irvine, John K. Marshall, Mary H. Perdue, "CD23-Mediated IgE Transport Across Human Intestinal Epithelium: Inhibition by Blocking Sites of Translation or Binding", *Gastroenterology*, 129(3): p928-940(2005)
- (6) Jiun-Bo Chen, Pheidias C. Wu, Alfur Fu-Hsin Hung, Chia-Yu Chu, Tsen-Fang Tsai, Hui-Ming Yu, Hwan-You Chang y Tse Wen Chang, "Unique epitopes on CεmX in IgE-B cell receptors are potentially applicable for targeting IgE-committed B cells", *J. Immunol.*, 184: 1748-1756 (2010)
- (7) Wiegand T. W., Williams P. B., Dreskin S. C., Jouvin M. H., Kinet J. P., Tasset D., "High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I", *J. Immunol.*, 157: p221-230 (1996)
- (8) Pathan N. I., Chu P., Hariharan K., Cheney C., Molina A., Byrd J., "Mediation of apoptosis by and antitumor activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines", *Blood*, 111(3):p1594-1602 (2008)
- (9) Wan T., Beavil R. L., Fabiane S. M., Beavil A. J., Sohi M. K., Keown M., Young R. J., Henry A. J., Owens R. J., Gould H. J., Sutton B. J., "The crystal structure of IgE Fc reveals an asymmetrically bent conformation", *Nature Immunol*, 3(7):681-6 (2002).

## 30 Breve descripción de los dibujos

La presente descripción se entenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada leída a la luz de los dibujos adjuntos, donde:

- 35 La Figura 1 ilustra la alineación de secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas variables que incluyen secuencias de V<sub>H</sub>1-69 y JH4 (V<sub>H</sub>1-69/JH4) de la línea germinal humana, anticuerpo anti-IgE murino 8D6 (mu8D6) y 8D6 humanizado injertado con 8D6 (hu8D6). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas. Los aminoácidos del marco V<sub>H</sub> murino retenido en hu8D6 están marcados con una estrella.
- 40 La Figura 2 ilustra la alineación de secuencias de aminoácidos de cadenas ligeras variables que incluyen secuencias de V<sub>K</sub>1-39 y Jk1 (V<sub>K</sub>1-39/Jk1) de la línea germinal humana, anticuerpo anti-IgE murino 8D6 (mu8D6) y 8D6 humanizado injertado con 8D6 (hu8D6). Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están subrayadas. Los aminoácidos del marco V<sub>K</sub> murino retenido en hu8D6 están marcados con una estrella.
- 45 La Figura 3 ilustra las curvas de titulación de hu8D6 (línea continua) y la unión del anticuerpo c8D6 progenitor (línea de puntos) a la IgE humana mediante ELISA.
- La Figura 4 ilustra las curvas de inhibición de hu8D6 (línea continua) y de 8D6 quimérico (c8D6, línea de puntos) para competir con c8D6 conjugado con HRP por la unión a IgE humana mediante ELISA.
- La Figura 5 ilustra las curvas de resonancia de plasmón superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) de Fab hu8D6 a IgE humana mediante análisis BIAcore. UR: Unidad de respuesta.
- 50 Las Figuras 6a y 6b ilustran la unión de hu8D6 y c8D6 a las estirpes celulares de Ramos que expresan mIgE.Fc mediante análisis de citometría de flujo. mIgE.FcL Ramos: células de Ramos que expresan la forma larga de IgE.Fc unida a la membrana humana (Fig. 6a); mIgE.FcS Ramos: células de Ramos que expresan la forma corta de IgE.Fc unida a la membrana humana (Fig. 6b).
- La Figura 7 ilustra la unión de hu8D6 a la cadena α recombinante saturada de IgE de FcεRI humano.
- 55 Las Figuras 8a a 8e ilustran la unión de hu8D6 a células RBL SX-38 que expresan FcεRI humano que se cargaron previamente con IgE humana.
- La Figura 9 ilustra las curvas de inhibición de hu8D6 y Omalizumab para competir con la proteína recombinante FcεRIα-Fc para unirse a la IgE humana mediante ELISA.
- La Figura 10 ilustra las curvas de inhibición de hu8D6 y Omalizumab para competir con el receptor nativo de FcεRI en células RBL SX-38 por la unión de IgE humana mediante análisis de citometría de flujo.
- 60 La Figura 11 ilustra la incapacidad de hu8D6 para activar y desencadenar la desgranulación de células RBL SX-38 sensibilizadas con IgE.
- La Figura 12 ilustra la unión de hu8D6 a CD23 humana trimérica recombinante saturada con IgE.
- Las Figuras 13a a 13d ilustran la unión de hu8D6 a células SKW6.4 que expresan CD23 humana.
- 65 Las Figuras 14a a 14e ilustran la incapacidad de los complejos inmunitarios hu8D6: IgE para unirse a células RBL SX-38 que expresan FcεRI humano.
- La Figura 15 ilustra la incapacidad de los complejos inmunitarios de hu8D6: IgE para activar e inducir la

desgranulación de células RBL SX-38 sensibilizadas con IgE.

Las Figuras 16a a 16d ilustran la unión de los complejos inmunitarios de hu8D6: IgE a las células SKW6.4 que expresan CD23 humana.

5 Las Figuras 17a y 17b ilustran los efectos inhibidores de Omalizumab (Fig. 17a) o hu8D6 (Fig. 17b) en la síntesis de IgE de novo *in vitro*.

#### Descripción detallada de la invención

10 La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados que se unen a (1) IgE humana en su forma libre secretada, a (2) IgE unida a la membrana en linfocitos B y a (3) IgE unida por CD23 en linfocitos B y (4) por CD23 libre en solución. Los anticuerpos anti-IgE no se unen a IgE unida por FcεRI en mastocitos y basófilos y, por lo tanto, no activan esas células inflamatorias. En una definición amplia, un anticuerpo humanizado es aquel en el que los dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras, y las regiones marco de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> son de origen humano.

15 Diferentes metodologías que emplean fagos, levadura o ribosomas para mostrar bancos de anticuerpos monocatenarios que comprenden los segmentos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los linfocitos B humanos, se han usado con éxito para la detección de anticuerpos para antígenos de superficie celular o factores celulares humanos. Dichas metodologías también pueden emplearse para detectar anticuerpos humanos de la presente invención con el conjunto único de especificidades de unión a IgE. Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse en ratones transgénicos que portan combinaciones de genes de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de inmunoglobulina humana.

20 A modo de ejemplo, la presente divulgación proporciona la descripción detallada de la preparación de una versión humanizada del anticuerpo monoclonal anti-IgE murino, 8D6, que posee el conjunto anterior de especificidades de unión. La presente invención proporciona un anticuerpo anti-IgE humana humanizado, hu8D6, que comprende una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 2) y una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 4). Las secuencias de aminoácidos de las regiones hipervariables de hu8D6 se identifican de la siguiente manera: CDR-H1 comprende GYTFNGYWMMH (SEQ ID NO: 5); CDR-H2 comprende YINPTTGHTTEYNQKFKD (SEQ ID NO: 6); CDR-H3 comprende ARQEYRHSWFAY (SEQ ID NO: 7); CDR-L1 comprende QSVDDYDGDY (SEQ ID NO: 8); CDR-L2 comprende AASNLDS (SEQ ID NO: 9); CDR-L3 comprende QQTNEPWT (SEQ ID NO: 10).

25 Se proporciona el anticuerpo anti-IgE humana humanizado, hu8D6, en donde las actividades de unión del anticuerpo en su forma bivalente a IgE humana es CE<sub>50</sub> = ~10<sup>-10</sup> M. La afinidad del anticuerpo en su forma Fab monovalente a IgE humana es KD = ~10<sup>-11</sup> M.

30 En los siguientes ejemplos, la divulgación se refiere al anticuerpo anti-IgE humanizado, hu8D6, que es capaz de unirse a la IgE humana libre (no unida por sus dos receptores), las IgE unidas a membrana (formas largas y cortas) en linfocitos B e la IgE unida a CD23, pero que es incapaz de unirse a IgE unida a FcεRI e inducir la liberación de hexosaminidasa de mastocitos o basófilos. Además, hu8D6 es capaz de inhibir eficazmente la unión de IgE a FCERI. El complejo inmunitario de hu8D6 e IgE humana es capaz de unirse a CD23, pero incapaz de unirse a FcεRI e inducir la liberación de hexosaminidasa de los mastocitos o basófilos. Además, hu8D6 puede tanto unirse a IgE unida a la membrana como entrecruzar la IgE unida a CD23 en los linfocitos B y, por lo tanto, puede inhibir la síntesis de novo de la producción de IgE de las células mononucleares periféricas humanas en un sistema de cultivo *in vitro*.

35 El anticuerpo anti-IgE humanizado, hu8D6, puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, una molécula de IgG), un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, Fab o F(ab')<sub>2</sub>) o un Fv monocatenario.

40 El presente anticuerpo anti-IgE humanizado, hu8D6, presenta propiedades terapéuticas y puede usarse para tratar enfermedades mediadas por IgE mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz del anticuerpo anti-IgE humanizado descrito en el presente documento, ya sea el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno. Las enfermedades mediadas por IgE incluyen asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria, urticaria (idiopática) espontánea crónica, rinosinusitis crónica, mastocitosis sistémica, mastocitosis cutánea, aspergilosis broncopulmonar alérgica, angioedema idiopático recurrente y trastorno gastrointestinal asociado con los eosinófilos. Se observa que algunas de esas enfermedades, tales como la urticaria espontánea crónica, mastocitosis sistémica y angioedema idiopático recurrente, no son enfermedades alérgicas y no implican alérgenos externos.

#### Ejemplo 1 Generación de un anticuerpo anti-IgE humanizado

##### Injerto de CDR

45 Se alinearon las secuencias de aminoácidos de los dominios V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 1) y V<sub>K</sub> (SEQ ID NO: 3) de 8D6 con las de los alelos V<sub>H</sub>1-69/JH4 y V<sub>K</sub>1-39/Jk1 de la línea germinal humana. Para fabricar el injerto de CDR, se usó el marco de V<sub>H</sub> aceptor, que difiere del alelo V<sub>H</sub>1-69 de la línea germinal humana en 4 posiciones M48I, R66K, V67A y S76N. Las CDR, que son las posiciones 26-35 (CDR-H1, SEQ ID NO: 5), 50-56 (CDR-H2, SEQ ID NO: 6) y 93-104 (CDR-H3, SEQ ID NO: 7) de 8D6 se diseñaron en el marco de V<sub>H</sub> aceptor para generar un injerto de CDR directo de V<sub>H</sub> de 8D6 como se muestra en la Fig. 1. En el dominio V<sub>K</sub>, las CDR de las posiciones 27-34 (CDR-L1, SEQ ID NO: 8), 50-

56 (CDR-L2, SEQ ID NO: 9) y 89-97 (CDR-L3, SEQ ID NO: 10) se injertaron en el marco de V<sub>k</sub> receptor, que difiere del alelo V<sub>k</sub>1-39 de la línea germinal humana en una posición M4L (Fig. 2). El injerto de CDR directo de V<sub>L</sub> de 8D6 se denominó V<sub>L</sub> de hu8D6 (SEQ ID NO: 4).

## 5 Producción de IgG

Para obtener anticuerpos 8D6 humanizados (hu8D6) y anticuerpos 8D6 quiméricos (c8D6), se usó el sistema de expresión Expi293<sup>TM</sup> (Invitrogen) para la expresión transitoria. La transfección se realizó en 30 ml de cultivo en matraces de 125 ml usando el reactivo ExpiFectamine<sup>TM</sup> 293 (Invitrogen). Un día antes de la transfección, se diluyeron células Expi293F<sup>TM</sup> con medio de expresión Expi293<sup>TM</sup> (Invitrogen) a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/ml. En el día de la transfección, se contaron los cultivos y se concentraron a  $2,5 \times 10^6$  células/ml mediante centrifugación, eliminando los medios viejos y añadiendo medio nuevo. Se prepararon complejos de transfección diluyendo 80  $\mu$ l de ExpiFectamine 293 en 1,5 ml de OPTI-MEM (Invitrogen) y 5 minutos después de añadir la solución diluida de ExpiFectamine 293<sup>TM</sup> a 30  $\mu$ g de ADN plasmídico. Luego, se incubaron 3 ml de solución de complejo de reactivo de transfección de ADN a temperatura ambiente durante 20 minutos y se añadieron lentamente al cultivo en suspensión mientras se agitaba con vórtice lentamente el matraz. Las células transfectadas se volvieron a colocar en el agitador orbital en una incubadora a 37 °C y se incubaron durante 16 horas. Después de la incubación, se añadieron al cultivo 150  $\mu$ l de potenciador de la transfección ExpiFectamine 293<sup>TM</sup> 1 y 1,5 ml de potenciador de la transfección ExpiFectamine 293<sup>TM</sup> 2. Los cultivos se terminaron el día 7 después de la transfección y se cosecharon para la purificación de los anticuerpos. Los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad rProtein-A Sepharose<sup>TM</sup> (GE Healthcare). El producto final resultó ser homogéneo según lo determinado mediante cromatografía líquida de proteína rápida de exclusión por tamaño, eluyéndose >99 % de la proteína como un máximo único de aproximadamente  $M_r$  de 150.000.

## 25 Análisis de unión (CE<sub>50</sub>)

La región Fc de IgE humana ( $\epsilon$ .Fc 2-4), que comienza en Ser<sup>226</sup> hasta Gly<sup>599</sup> de acuerdo con el sistema de numeración descrito previamente por Wan *et al.* (*Nature Immunol.*, 2002, 3:681-686) y que contiene dos mutaciones N265Q y N371Q, se expresó en células Expi293F<sup>TM</sup> y se purificó mediante cromatografía de inmunoafinidad anti-IgE usando resina Sepharose<sup>TM</sup> activada con NHS acoplada a Omalizumab (GE Healthcare). Para la determinación de la CE<sub>50</sub> de hu8D6, se inmovilizó la proteína  $\epsilon$ .Fc 2-4 en placas de 96 pocillos a 50 ng/pocillo en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6) y se incubó a 4 °C durante la noche. Se bloquearon los pocillos recubiertos con 200  $\mu$ l/pocillo de diluyentes de ensayo (BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 %, timerosal al 0,01 % en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado (PBS con Tween-20 al 0,05 %). Se añadieron 100  $\mu$ l de diluyentes de anticuerpos (diluidos en serie desde 0,1 mg/ml en 1:3 etapas) a los pocillos recubiertos. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas. Todos los pocillos fueron aspirados y lavados 6 veces con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado. Las placas se incubaron con una dilución 1:10.000 de anticuerpo IgG-Fc anti-murino de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jason ImmunoResearch) durante 1 hora (100  $\mu$ l/pocillo). Luego, todos los pocillos se lavaron seis veces con 200  $\mu$ l/pocillo de tampón de lavado. Finalmente, los pocillos se desarrollaron con 50  $\mu$ l/pocillo de sustrato NeA-Blue TMB (Clinical Science Products) y la reacción se detuvo mediante la adición de 50  $\mu$ l/pocillo de HCl 1 N. Se midió la absorbancia a DO<sub>450</sub> en un lector de ELISA. La CE<sub>50</sub> se calculó utilizando el software Prism (GraphPad). Como se muestra en la Fig. 3, las CE<sub>50</sub> de hu8D6 y c8D6 fueron  $1,48 \times 10^{-10}$  y  $1,16 \times 10^{-10}$  M. Los resultados indican que la actividad de unión de hu8D6 se conservó casi por completo después del proceso de injerto de CDR.

## 45 Análisis de competencia (CI<sub>50</sub>)

Se realizaron pruebas ELISA competitivas para comparar la eficacia de hu8D6 y c8D6 para competir con c8D6 conjugado con HRP en la unión a IgE humana para determinar la propiedad de unión de hu8D6. Se recubrieron los pocillos de las placas de ELISA con 50 ng de proteína  $\epsilon$ .Fc 2-4 en tampón de recubrimiento durante la noche a 4 °C y se bloquearon incubando con diluyentes de ensayo. Por separado, se diluyó una solución madre de HRP-c8D6 1:1.000 en diluyentes de ensayo y las alícuotas se mezclaron con c8D6 o hu8D6 sin conjugar diluido en serie desde 0,1 mg/ml en 1:3 etapas. Se añadieron ambas series de mezclas a los pocillos de ELISA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con PBST, se incubaron con TMB y su DO<sub>450</sub>. La CI<sub>50</sub> se calculó usando el software Prism. Las CI<sub>50</sub> de hu8D6 y c8D6 sin conjugar resultaron ser de  $1,79 \times 10^{-9}$  y  $2,28 \times 10^{-9}$  M como se muestra en la Fig. 4. Los resultados indicaron que hu8D6 se unió a un epítipo idéntico a 8D6.

## Determinación de KD mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR)

60 Para producir Fab de hu8D6, Se unieron respectivamente ADNc de los segmentos de ADN de V<sub>H</sub> y V<sub>k</sub> del anticuerpo hu8D6 a un dominio C 1-CH1 humano y a una región C humana de un vector de expresión de Fab que se modificó del vector plgG1() reemplazando toda la región constante C 1 por el dominio C 1-CH1 (Chen *et al.* *J Immunol.* 184:1748-1756). Se usó el sistema de expresión Expi293<sup>TM</sup> (Invitrogen) para la expresión transitoria. Los Fab de Hu8D6 se purificaron de los sobrenadantes usando cromatografía de afinidad KappaSelect Sepharose<sup>TM</sup> (GE Healthcare). El producto final resultó ser homogéneo según lo determinado mediante cromatografía líquida de proteína rápida de exclusión por tamaño, eluyéndose >99 % de la proteína como un máximo único de aproximadamente  $M_r$  de

50.000.

Para la determinación de KD de hu8D6, se realizaron los ensayos de SPR con un instrumento Biacore X (GE Healthcare). Se inmovilizó Fab de Hu8D6 en un chip CM5 (GE Healthcare) usando un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare). La densidad de acoplamiento se limitó a < 500 unidades de resonancia. Se inyectó proteína  $\epsilon$ .Fc 2-4 sobre el chip sensor a concentraciones de 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM en tampón HBS-P (GE Healthcare) a un caudal de 30  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Todas las muestras se inyectaron en la celda de flujo durante 120 s con un tiempo de disociación de 720 s a 25 °C. La regeneración de la superficie del sensor se realizó con dos inyecciones de 30 segundos de glicina-HCl 10 mM (pH 2,5). Los sonogramas de  $\epsilon$ .Fc 2-4, a diferentes concentraciones, en unión a Fab de hu8D6 inmovilizado se mostró en la Fig. 5. Las constantes de afinidad y velocidad se calcularon usando el software BIAevaluation (GE Healthcare), mostrando que la constante de asociación y la constante de disociación de Fab de hu8D6 a  $\epsilon$ .Fc 2-4 son de  $1,23\pm 0,17 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  y  $5,79\pm 0,03 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ , Haciendo que KD de hu8D6 sea de  $4,8 \pm 0,7 \times 10^{-11} \text{ M}$ .

#### Análisis de FACS

Las estirpes celulares de Ramos que se transfectaron con ADN recombinante codificante de mIgE.FcL (cola citoplasmática-C<sub>H</sub>2 de la forma larga de la cadena  $\epsilon$  de membrana) o mIgE.FcS (cola citoplasmática-C<sub>H</sub>2 de la forma corta de la cadena  $\epsilon$  de la membrana) fueron generadas por Chen *et al.* (Chen *et al. J Immunol.* 184: 1748-1756) y se usaron para determinar la actividad de unión de hu8D6. Se volvieron a suspender células de Ramos que expresaban mIgE.FcL o mIgE.FcS en tampón FACS (FBS al 1 % y azida de sodio al 0,1 % en 1 x PBS) a una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/ml. Se incubaron  $2 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS con hu8D6 o c8D6 a la concentración de 10, 1, 0,1, 0,01 y 0,001  $\mu\text{g/ml}$ , durante 30 minutos en hielo, seguido del lavado con tampón FACS. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante IgG de cabra marcada con FITC específica de IgG-Fc de ser humano (Laboratorios Caltag). Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences). Se analizaron las medias geométricas de la intensidad de fluorescencia para la unión de anticuerpos a estirpes celulares de Ramos usando el software FCSExpress (software DeNovo). La CE<sub>50</sub> se calculó usando el software Prism. Como se muestra en las Fig. 6a y 6b, las CE<sub>50</sub> de hu8D6 y c8D6 para unirse a las células de Ramos que expresaban mIgE.FcL fueron de  $2,21 \times 10^{-10}$  y de  $2,0 \times 10^{-10}$ , y las CE<sub>50</sub> de hu8D6 y c8D6 a células Ramos que expresaban mIgE.FcS fueron de  $3,86 \times 10^{-10}$  y de  $3,0 \times 10^{-10}$ . Los resultados indicaron que las actividades de unión de hu8D6 y c8D6 a dos isoformas de mIgE fueron aproximadamente iguales.

Ejemplo 2 Incapacidad de hu8D6 para unirse a la IgE unida a Fc $\epsilon$ RI humano

#### Incapacidad de hu8D6 para unirse a la cadena recombinante saturada de IgE de Fc $\epsilon$ RI humano

Se utilizó un ELISA para determinar la unión de hu8D6 a la proteína de fusión de Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  recombinante en fase sólida (huFc $\epsilon$ RI $\alpha$ -huFc $\gamma$ 1, denominada Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Fc), que comprendía la región extracelular de Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  humano (de Val<sup>26</sup> a Leu<sup>204</sup>) y la porción bisagra-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 de  $\gamma$ 1 humana (Shiung *et al., Immunobiology*, 2012, 217:676-683). La proteína Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Fc se expresó mediante el sistema FreeStyle™ 393F (Invitrogen) y se purificó mediante cromatografía de proteína A. Se recubrieron los pocillos de las placas de ELISA con 2  $\mu\text{g/ml}$  de Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Fc en tampón de recubrimiento a 4 °C durante la noche y se trataron con diluyentes de ensayo (BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 %, timerosal al 0,01 % en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se saturaron las proteínas Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Fc recubiertas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de IgE, que se purificó del medio de cultivo de células U266 mediante cromatografía anti-IgE. Tras lavar los pocillos 6 veces con tampón de lavado, se incubó la IgE capturada con IgE humana (Sigma), hu8D6, c8D6, Omalizumab y un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana murino 5H2 (AbD Serotec) a 10, 1, 0,1 y 0,01  $\mu\text{g/ml}$ . La IgE humana unida y la IgG murina se detectaron usando la cadena ligera anti-kappa humana de cabra conjugada con HRP (GeneTex) y IgG.Fc anti-murino de cabra conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch). 8D6 humanizado, c8D6 y Omalizumab no se unieron a la proteína de fusión Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  recombinante saturada de IgE, mientras que 5H2 lo hizo a todas las concentraciones como se muestra en la Fig. 7.

#### Incapacidad de hu8D6 para unirse a IgE en basófilos

Se usaron células RBL SX-38, células de leucemia basófila de rata transferidas con genes codificantes de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de Fc $\epsilon$ RI humano (Wiegand *et al., J. Immunol.*, 1996, 157:221-230) como una combinación de Fc $\epsilon$ RI de la superficie celular. Se incubaron  $2 \times 10^6$  células RBL SX-38 en 1 ml de tampón FACS con IgE a una concentración de 3  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con tampón FACS para eliminar la IgE no unida y luego se incubaron  $2 \times 10^5$  células en 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS con hu8D6, c8D6, Omalizumab y anticuerpo 5H2 a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  durante 30 minutos en hielo, seguido del lavado con tampón FACS. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante IgG de cabra marcada con FITC específica de IgG-Fc humano o IgG anti-murina de conejo F(ab)'2 marcada con FITC (AbD Serotec). Las células teñidas se analizaron en FACS Canto II. Como se muestra en las Fig. 8a a 8e, 8D6 humanizado, c8D6 y Omalizumab no pudieron unirse a las células RBL SX-38 saturadas de IgE, y 5H2 se unió a las células RBL SX-38.

#### Análisis competitivo de la proteína Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ -Fc

Se realizaron pruebas ELISA competitivas para comparar la eficacia de hu8D6 y Omalizumab para competir con IgE

conjugada con HRP en la unión a la proteína FcεRIα-Fc (Shiung *et al*). Se recubrieron los pocillos de las placas ELISA con 100 ng de proteína IgE U266 en tampón de recubrimiento durante la noche a 4 °C y se bloquearon incubando con diluyentes de ensayo (BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 %, timerosal al 0,01 % en PBS). Por separado, se diluyó una solución madre de HRP-IgE 1:6000 en diluyentes de ensayo y las alícuotas se mezclaron con hu8D6 u Omalizumab sin conjugar diluido en serie desde 0,1 mg/ml en 1:3 etapas. Se añadieron ambas series de mezclas a los pocillos de ELISA y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con PBST, se incubaron con TMB y su DO<sub>450</sub>. La CI<sub>50</sub> se calculó usando el software Prism. Trastuzumab (Herceptin™), que se dirigió a la proteína HER2 humana como control negativo, no inhibió la unión de IgE a FcεRIα-Fc. La CI<sub>50</sub> de hu8D6 y Omalizumab para inhibir la unión de IgE a FcεRIα-Fc fue de 9,4 y 25,9 x 10<sup>-10</sup> M como se muestra en la Fig. 9, indicando que hu8D6 es superior a Omalizumab en la inhibición de la unión de IgE a su receptor.

#### Análisis competitivo de FcεRI de la superficie celular

Se incubaron 2 x 10<sup>5</sup> células RBL SX-38 en 0,1 ml de tampón FACS con hu8D6, Omalizumab o Trastuzumab a diferentes concentraciones de 45, 30, 13,3, 8,9, 5,93, 3,95, 2,63, 1,76, 1,17, 0,78, 0,52 y 0,35 µg/ml, así como IgE marcada con FITC (4,5 µg/ml) durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con tampón FACS para eliminar la IgE no unida. Las células teñidas se analizaron en FACS Canto II. La CI<sub>50</sub> se calculó usando el software Prism. Trastuzumab no afectó a la unión de IgE a las células SX-38. Las CI<sub>50</sub> de hu8D6 y Omalizumab para inhibir la unión de IgE a las células SX-38 fueron de 18,8 x 10<sup>-9</sup> y 24,7 x 10<sup>-9</sup> M como se muestra en la Fig. 10, indicando que hu8D6 es superior a Omalizumab en la inhibición de la unión de IgE a las células que expresan FcεRI.

#### Ejemplo 3 Incapacidad de hu8D6 para sensibilizar las células RBL SX-38

Se evaluó el grado de desgranulación midiendo la liberación de β-hexosaminidasa, una enzima lisosómica almacenada en gránulos, al medio de cultivo. Se sembraron células RBL SX-38 en una placa de 24 pocillos a 3 x 10<sup>5</sup> células/pocillo en 0,5 ml de medio de cultivo durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se retiró el medio y se añadieron a cada pocillo 0,25 ml de medio de cultivo previamente calentado que contenía 1 µg/ml de IgE humana. Tras 2 horas de incubación en una incubadora a 37 °C, cada pocillo se lavó dos veces con 0,5 ml de tampón de Tyrode (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, glucosa 5,6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 20 mM y 0,5 mg/ml de BSA, pH 7,3) y luego 0,25 ml de tampón Tyrode previamente calentado que contenía 10, 1, 0,1 o 0,01 µg/ml de anticuerpos o Triton X-100 al 1 %. Tras una incubación de 30 minutos en una incubadora a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 300 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se transfirieron 50 µl de sobrenadantes transparentes de cada pocillo a una nueva placa OptiPlate™ negra de 96 pocillos (Perkin-Elmer). Se añadieron 50 µl de solución de sustrato (80 µM de 4-MUG (4-metilumbeliferil-*N*-acetil-*D*-glucosaminida), Sigma) en tampón de ácido cítrico 0,1 M (pH 4,5) a cada pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. La reacción se terminó añadiendo 100 µl de tampón de glicina (glicina 0,2 M, NaCl 0,2 M, pH 10,7). Se midió la fluorescencia resultante (excitación a 355 nm; emisión a 460 nm) en la parte superior de cada pocillo mediante un lector de fluorescencia Victor™ 3 (Perkin-Elmer). Los valores medidos se expresaron como porcentajes relativos al valor de liberación (100 %) obtenido al lisar las células con Triton X-100 al 1 %. hu8D6 humanizado, c8D6 y Omalizumab no indujeron la desgranulación de las células RBL SX-38 sensibilizadas con IgE, mientras que 5H2 lo hizo (Fig. 11).

#### Ejemplo 4 capacidad de hu8D6 para unirse a IgE humana unida a CD23

##### Capacidad de hu8D6 para unirse a CD23 humana trimérica recombinante saturada de IgE

Se usó un ELISA para determinar la unión de hu8D6 a la proteína de fusión CD23 humana recombinante en fase sólida (ILZ-CD23), que contiene cremallera de isoleucina N-terminal (ILZ) y región extracelular (Asp<sup>48</sup> a Ser<sup>321</sup>) de CD23 humana y forma un trímero no covalente a través del motivo ILZ (Shiung *et al.*, *Immunobiology*, 2012, 217:676-683). La ILZ-CD23 marcada con polihistidina fue expresada por el sistema FreeStyle™ 293F, se purificó del medio de cultivo de transfección usando cromatografía Sepharose™ de níquel (GE Healthcare), y luego se conservó en 1 x tampón HBSS con CaCl<sub>2</sub> 2 mM. Se recubrieron placas de ELISA con ILZ-CD23 purificada a 5 µg/ml y se bloquearon, y se saturó la ILZ-CD23 recubierta con 3 µg/ml de IgE humana purificada en diluyentes de ensayo de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 % y timerosal al 0,01 % en PBS). Tras lavar los pocillos 6 veces con tampón de lavado, se incubó la IgE capturada con hu8D6, c8D6, Omalizumab y 5H2 a 10, 1, 0,1 y 0,01 µg/ml en diluyentes de ensayo de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. La IgG humana y la IgG murina unidas se detectaron usando anticuerpo anti-IgG.Fc humano de cabra conjugado con HRP y anticuerpo anti-IgG.Fc murino de cabra conjugado con HRP. hu8D6 humanizado, c8D6 y anticuerpo 5H2, pudieron unirse a CD23 recombinante saturada de IgE humana recubierta sobre una superficie sólida, mientras que Omalizumab no tiene actividad de unión, comparable a los anticuerpos anti-IgG humana de control de isotipo como se muestra en la Fig. 12.

##### Capacidad de hu8D6 para unirse a linfocitos B SKW6.4 pulsados con IgE

Se usó una estirpe de linfocitos B humanos que expresaba un alto nivel de CD23 (Pathan *et al.*, *Blood*, 2008, 111:1594-1602) para pulsar CD23 mediante la incubación con IgE. Se incubaron 2 x 10<sup>6</sup> células SKW6.4 en 1 ml de tampón FACS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, FBS al 1 % y azida de sodio al 0,1 % en 1 x PBS) con IgE a una concentración de 3 µg/ml durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con tampón FACS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> incubado

con hu8D6, c8D6, Omalizumab y anticuerpo anti-CD23 (Clon: EBVCS2, eBioscience) a una concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos en hielo, seguido del lavado con tampón FACS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante IgG de cabra marcada con FITC específica de IgG-Fc humano o anticuerpo anti-IgG murina de conejo F(ab)'2 marcado con FITC. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto™ II. Se descubrió que anti-CD23 se unió bien a los linfocitos B skw6.4 como control positivo. Se impidió que Omalizumab se uniera a IgE unida por CD23, mientras que hu8D6 y c8D6 pudieron unirse eficazmente a IgE en células SKW6.4 como se muestra en las Fig. 13a a 13d.

Ejemplo 5 Incapacidad del complejo inmunitario de hu8D6 E IgE para unirse a FcεRI humano

Preparación del complejo inmunitario de hu8D6 e IgE

IgE humana purificada (aproximadamente 190 kDa), hu8D6, c8D6, Omalizumab y 5H2 (aproximadamente 150 kDa) se diluyeron a 1 mg/ml en 1 x PBS. Se prepararon mezclas que contenían complejos inmunitarios de anti-IgE:IgE mezclando 95 µl de IgE humana a 1 mg/ml, 75 µl de anticuerpos monoclonales anti-IgE a 1 mg/ml. Las mezclas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y se usaron para un uso adicional.

Incapacidad del complejo inmunitario de hu8D6 e IgE para unirse a células RBL SX-38

Se incubaron 2 x 10<sup>5</sup> células RBL SX-38 en 100 l de tampón FACS con complejos inmunitarios de hu8D6:IgE, c8D6:IgE, omalizumab:IgE y 5H2:IgE a una concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos en hielo, seguido del lavado con tampón FACS. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante IgG de cabra marcada con FITC específica de IgG-Fc humano o anticuerpo anti-IgG murina de conejo F(ab)'2 marcado con FITC. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto™ II. Como se muestra en las Fig. 14a a 14e, los complejos inmunitarios de hu8D6:IgE, c8D6:IgE y Omalizumab:IgE no pudieron unirse a las células RBL SX-38 mientras que anti-FcεRI y 5H2:IgE sí se unieron.

Incapacidad del complejo inmunitario de hu8D6 e IgE para activar las células RBL SX-38

Se sembraron 3 x 10<sup>5</sup> células RBL SX-38 en una placa de 24 pocillos en 0,5 ml de medio de cultivo durante una noche en una incubadora a 37 °C. Al día siguiente, se lavó cada pocillo dos veces con 0,5 ml de tampón Tyrode y luego se añadieron 0,25 ml de tampón Tyrode previamente calentado que contenía 10 µg/ml de los complejos inmunitarios de anti-IgE:IgE o Triton X-100 al 1 %. Tras 30 minutos de incubación a 37 °C, se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 300 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se transfirieron 50 µl de sobrenadante transparente de cada pocillo a una nueva placa OptiPlate™ negra de 96 pocillos (Perkin-Elmer). Se añadieron 50 µl de solución de sustrato 4-MUG a cada pocillo y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. La reacción se terminó mediante la adición de 100 µl de tampón de glicina. Como se muestra en la Fig. 15, los complejos inmunitarios de hu8D6:IgE, c8D6:IgE y Omalizumab:IgE no indujeron la desgranulación de las células RBL SX-38 mientras que sí lo hizo 5H2:IgE.

Ejemplo 6 Capacidad del complejo inmunitario de hu8D6 e IgE para unirse A CD23 humana

Se incubaron 2 x 10<sup>5</sup> células SKW6.4 en 100 µl de tampón FACS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> con complejos inmunitarios de hu8D6:IgE, c8D6:IgE, Omalizumab:IgE y anti-CD23 a una concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos en hielo, seguido del lavado con tampón FACS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>. Los complejos inmunitarios de anti-IgE:IgE unidos se detectaron mediante IgG de cabra marcada con FITC específica de IgG-Fc humano o anticuerpo anti-IgG murina de conejo F(ab)'2 marcado con FITC. Las células teñidas se analizaron en un citómetro de flujo FACS Canto™ II. Como se muestra en las Fig. 16a a 16d, el complejo inmunitario de Omalizumab:IgE no pudo unirse a CD23 de la superficie, mientras que los complejos inmunitarios de hu8D6:IgE, c8D6:IgE y anti-CD23 fueron capaces de unirse eficazmente a las células SKW6.4.

Ejemplo 7 Capacidad de hu8D6 para inhibir la producción de IgE de PBMC

Se purificaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre de donantes sanos o pacientes atópicos mediante centrifugación sobre un gradiente de densidad Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare). Las PBMC aisladas se suspendieron a 10<sup>6</sup> células/ml en medio IMDM completo (Invitrogen) con IL-4 humana a 100 ng/ml (sistemas de I + D) y 100 ng/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD40 de ratón (BioLegend, clon: G28-5). Se añadieron hu8D6 humanizado, Omalizumab y Trastuzumab al medio a una concentración de 10 µg/ml. Tras un cultivo de 7, 11 y 14 días, se cosecharon los sobrenadantes libres de células y se almacenaron a -20 °C. La IgE liberada en los sobrenadantes se midió mediante ELISA usando anticuerpo anti-IgE humana, HP6061 (Abcam), como anticuerpo de captura y anticuerpo anti-IgE humana marcado con biotina, HP6029 (Abcam), como anticuerpo de detección. Brevemente, se inmovilizó el HP6061 en placas de 96 pocillos a 100 ng/pocillo en tampón de recubrimiento (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 15 mM, NaHCO<sub>3</sub> 35 mM, pH 9,6) y se incubó a 4 °C durante la noche. Se bloquearon los pocillos recubiertos con 200 µl/pocillo de diluyentes de ensayo (BSA al 0,5 %, Tween-20 al 0,05 %, ProClin 300 al 0,02 % en PBS) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas 3 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado (PBS con Tween-20 al 0,05 %). Se usó IgE U266 purificada para generar una curva patrón (intervalo de 800 a 3,125 ng/ml

mediante dilución con factor de dilución de 2). Para mejorar la precisión de la calificación de la IgE, los patrones de IgE se prepararon en medio IMDM completo y se les añadió hu8D6, Omalizumab o Trastuzumab a 10 µg/ml. Se añadieron 100 µl de los sobrenadantes transparentes y patrones a los pocillos recubiertos. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora. Todos los pocillos fueron aspirados y lavados 6 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado. La IgE capturada se incubó con 100 µl de solución de anticuerpo de detección (50 ng/ml de HP6029 marcado con biotina en diluyente de ensayo) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se detectó el HP6029 marcado con biotina unido usando estreptavidina poli-HRP (dilución 1:10.000, Thermo Pierce) durante 1 hora (100 µl/pocillo). Todos los pocillos fueron aspirados y lavados 6 veces con 200 µl/pocillo de tampón de lavado. Finalmente, los pocillos se desarrollaron con 100 µl/pocillo de sustrato NeA-Blue TMB (Clinical Science Products) y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M. Se creó la curva patrón usando el software SoftMax Pro (Molecular Devices) para generar un ajuste de curva logística de cuatro parámetros y se usó para calcular las concentraciones de IgE en todas las muestras analizadas. Se usaron las pruebas t de Student para comparar datos usando el software Prism. Como se muestra en las Fig. 17a y 17b, hu8D6 a 10 mg/ml en el inicio de los cultivos redujo los niveles de IgE de los cultivos en un 88,1 %, 93,4 % y 88,6 %, mientras que Omalizumab redujo los niveles de IgE en un 21,3 %, 26,4 y 30 % en una incubación de 7, 11 y 14 días, respectivamente. Los resultados sugieren que hu8D6, capaz de unirse a IgE unida a la membrana y unida a CD23 en linfocitos B, es superior a Omalizumab, que no se une a IgE ya unida por CD23, en la inhibición de la síntesis de IgE de novo.

Listado de secuencias

- 20 <110> Academia Sinica
- <120> ANTICUERPOS ANTI-IGE HUMANIZADOS QUE ENTRECROZAN CD23 EN LINFOCITOS B, PERO NO SENSIBILIZAN LOS MASTOCITOS
- 25 <130> P2800-PCT
- <150> US62013196
- 30 <151> 17/06/2014
- <160> 12
- <170> BiSSAP 1.3
- 35 <210> 1
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> *Mus* sp.
- 40 <220>
- <223> región variable de la cadena pesada derivada del hibridoma 8D6
- <400> 1
- |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Ala | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ser | Val | Met | Leu | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Asn | Gly | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Trp | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Asp | Leu | Glu | Trp | Ile |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Gly | Tyr | Ile | Asn | Pro | Thr | Thr | Gly | His | Thr | Glu | Tyr | Asn | Gln | Lys | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Lys | Asp | Lys | Ala | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Glu | Ser | Ser | Asn | Thr | Ala | Tyr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Asp | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Ala | Arg | Gln | Glu | Tyr | Arg | His | Ser | Trp | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ala |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 115 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
- 45 <210> 2
- <211> 119
- <212> PRT
- 50 <213> Secuencia artificial

ES 2 811 303 T3

<220>

<223> región variable humanizada de cadena pesada

5 <400> 2

```

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

Ala Arg Gln Glu Tyr Arg His Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
      100      105      110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 3

10 <211> 111

<212> PRT

<213> *mus* sp.

<220>

15 <223> región variable de la cadena ligera derivada del hibridoma 8D6

<400> 3

```

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

```

20

<210> 4

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> región variable humanizada de cadena ligera

<400> 4

30

ES 2 811 303 T3

```

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

```

5 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *mus* sp.

10 <220>  
 <223> región determinante de complementariedad 1 derivada de la cadena pesada del anticuerpo mu8D6  
 <400> 5

```

Gly Tyr Thr Phe Asn Gly Tyr Trp Met His
1           5           10

```

15 <210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus* sp.

20 <220>  
 <223> región determinante de complementariedad 2 derivada de la cadena pesada del anticuerpo mu8D6  
 <400> 6

```

Tyr Ile Asn Pro Thr Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1           5           10           15
25 Asp

```

30 <210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *mus* sp.

35 <220>  
 <223> región determinante de complementariedad 3 derivada de la cadena pesada del anticuerpo mu8D6  
 <400> 7

```

Ala Arg Gln Glu Tyr Arg His Ser Trp Phe Ala Tyr
1           5           10

```

40 <210> 8  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *mus* sp.

45 <220>  
 <223> región determinante de complementariedad 1 derivada de la cadena ligera del anticuerpo mu8D6

ES 2 811 303 T3

<400> 8

Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Thr Tyr  
1 5 10

5 <210> 9  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *mus* sp.

10 <220>  
<223> región determinante de complementariedad 2 derivada de la cadena ligera del anticuerpo mu8D6

<400> 9

Ala Ala Ser Asn Leu Asp Ser  
1 5

15 <210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
20 <213> *mus* sp.

<220>  
<223> región determinante de complementariedad 3 derivada de la cadena ligera del anticuerpo mu8D6

25 <400> 10

Gln Gln Thr Asn Glu Asp Pro Trp Thr  
1 5

30 <210> 11  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

35 <220>  
<223> la secuencia de VH1-69/JH4 de la línea germinal del gen de inmunoglobulina humana

<400> 11

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

40 <210> 12  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

45 <220>  
<223> la secuencia de Vk1-39/Jk1 de la línea germinal del gen de inmunoglobulina humana

ES 2 811 303 T3

<400> 12

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo humanizado que tiene una actividad de unión a IgE humana libre, IgE unidas a la membrana en linfocitos B e IgE unida a CD23, pero que es incapaz de unirse a IgE unida a FcεRI, en donde dicho anticuerpo humanizado comprende una región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y una región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>), en donde la región variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 2; y en donde la región variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a SEQ ID NO: 4.
- 10 2. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un fragmento de unión al antígeno.
3. El anticuerpo humanizado de la reivindicación 2, en donde el fragmento de unión al antígeno es Fab, F(ab')<sub>2</sub> o Fv monocatenario.
- 15 4. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo humanizado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Un anticuerpo humanizado para usar en el tratamiento de una enfermedad mediada por IgE, en donde el anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la enfermedad mediada por IgE es asma alérgica, rinitis alérgica, dermatitis atópica, alergia alimentaria, urticaria (idiopática) espontánea crónica, rinosinusitis crónica, mastocitosis sistémica, mastocitosis cutánea, aspergilosis broncopulmonar alérgica, angioedema idiopático recurrente y trastorno gastrointestinal asociado con los eosinófilos.

	1	10	20	30	40	50
$V_H 1-69/J_H 4$	Q	V	Q	L	V	Q
$V_H$ de mu8D6	Q	V	Q	L	V	Q
$V_H$ de hu8D6	Q	V	Q	L	V	Q
	51a	60	70	80	abc	90
$V_H 1-69/J_H 4$	I	I	P	I	F	G
$V_H$ de mu8D6	I	N	P	T	T	G
$V_H$ de hu8D6	I	N	P	T	T	G
	100	110				
$V_H 1-69/J_H 4$	---	Y	F	D	Y	W
$V_H$ de mu8D6	Y	R	H	S	W	F
$V_H$ de hu8D6	Y	R	H	S	W	F

\*  
\*\*

FIG. 1

	1	10	20	abcd	30	40
$V_k1-39/J_k1$	DIQMTQSPSSLSASVGD	RVITITCRASQ	SIS---	SYLNWYQQKPK	KAPKL	
$V_k$ de mu8D6	DIVLTQSPASLAVSLG	RATISCKASQ	SVDYDGD	<u>TYM</u>	<u>NWYHQKPGQ</u>	PKL
$V_k$ de hu8D6	DIQLTQSPSSLSASVGD	RVITITCRASQ	SVDYDGD	<u>TYM</u>	<u>NWYQQKPK</u>	KAPKL
	*					
	50	60	70	80	90	
$V_k1-39/J_k1$	LIYAASSLQSGVPSRF	SGSGGTDFTLTI	SSLPEDFAT	YCYC	QQS-Y	STW
$V_k$ de mu8D6	<u>LIYAASNLD</u>	<u>SGIPARFSGSGG</u>	<u>TDFTLN</u>	<u>IHPVEE</u>	<u>DAATYCYC</u>	<u>QQTNE</u>
$V_k$ de hu8D6	<u>LIYAASNLD</u>	<u>SGVPSRFSGSGG</u>	<u>TDFTLTI</u>	<u>SSLPEDFAT</u>	<u>YCYC</u>	<u>QQTNE</u>
	100	107				
$V_k1-39/J_k1$	<u>TFGQGT</u>	<u>KVEIKR</u>	(SEQ ID NO: 12)			
$V_k$ de mu8D6	<u>TFGGG</u>	<u>TKLEIKR</u>	(SEQ ID NO: 3)			
$V_k$ de hu8D6	<u>TFGQGT</u>	<u>KVEIKR</u>	(SEQ ID NO: 4)			

FIG. 2

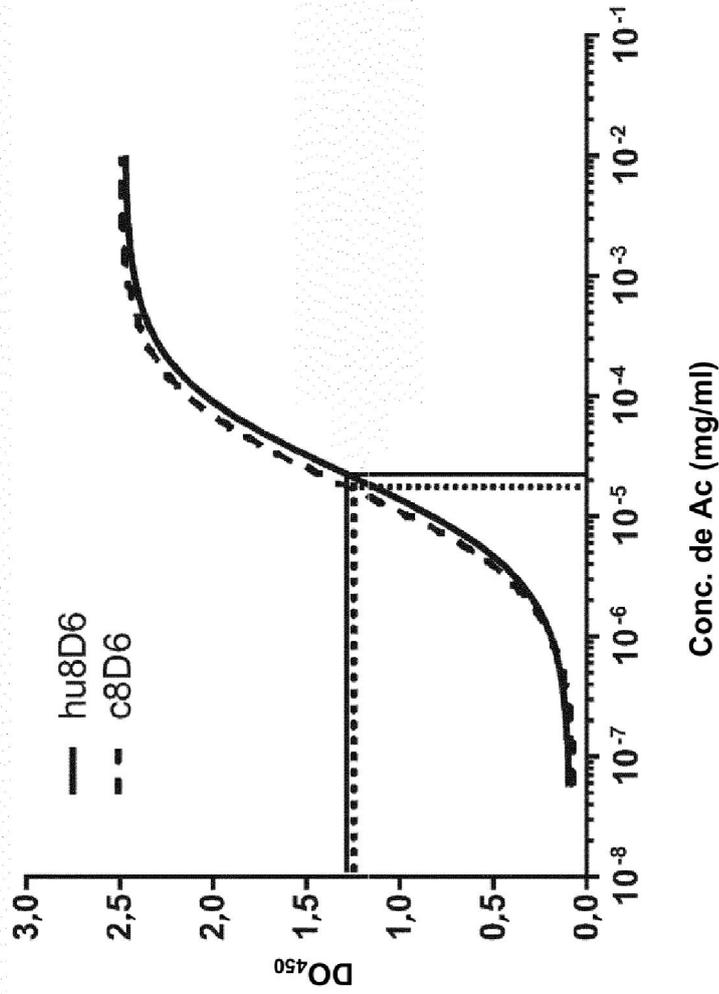


FIG. 3

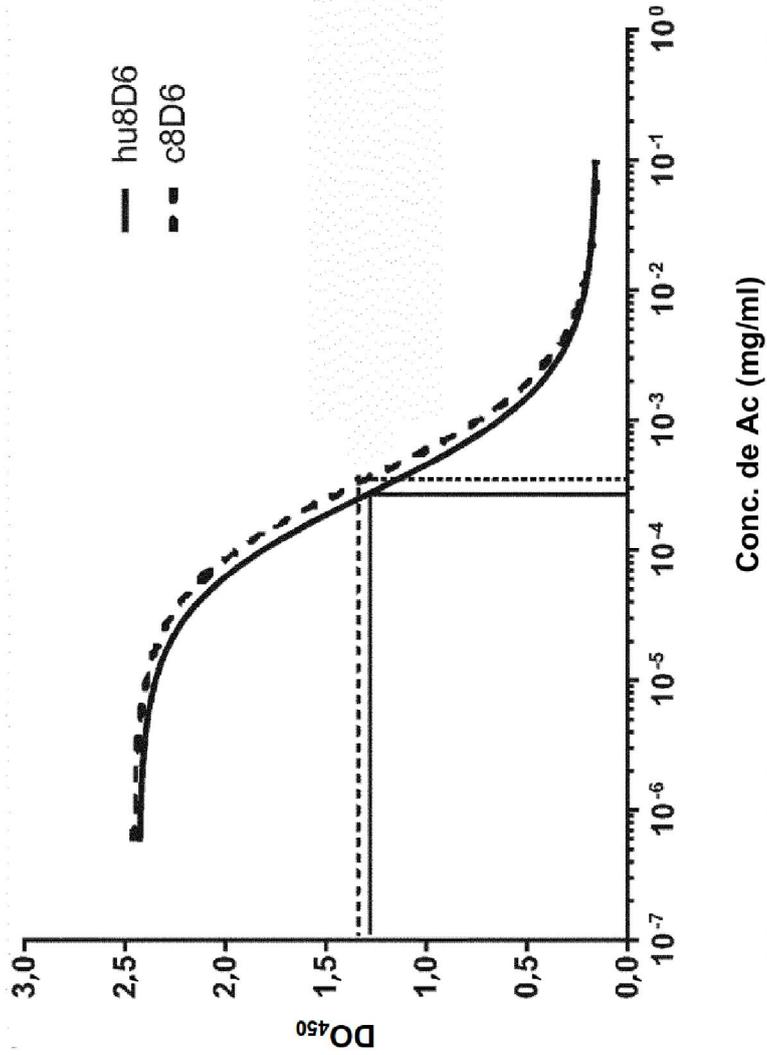


FIG. 4

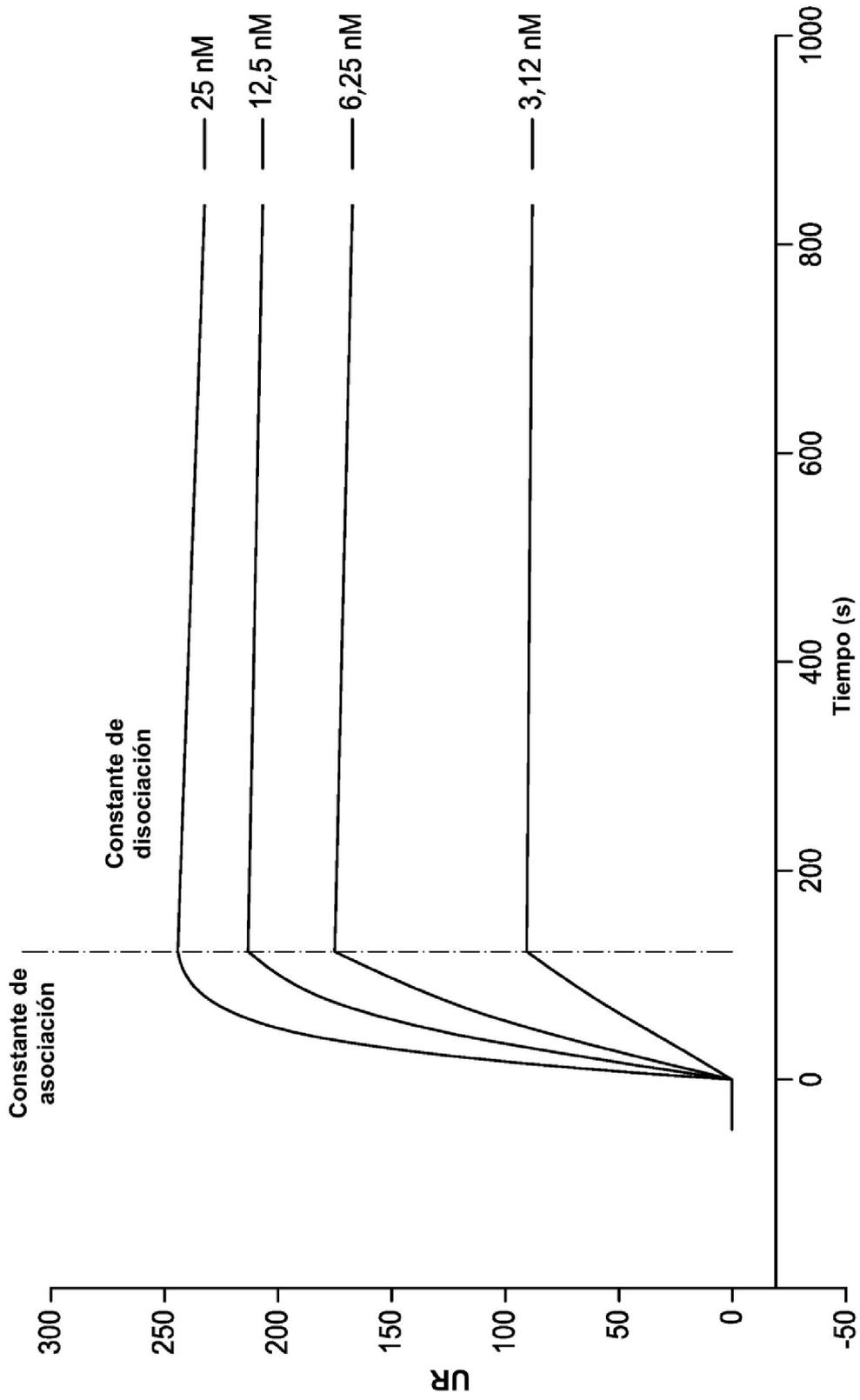


FIG. 5

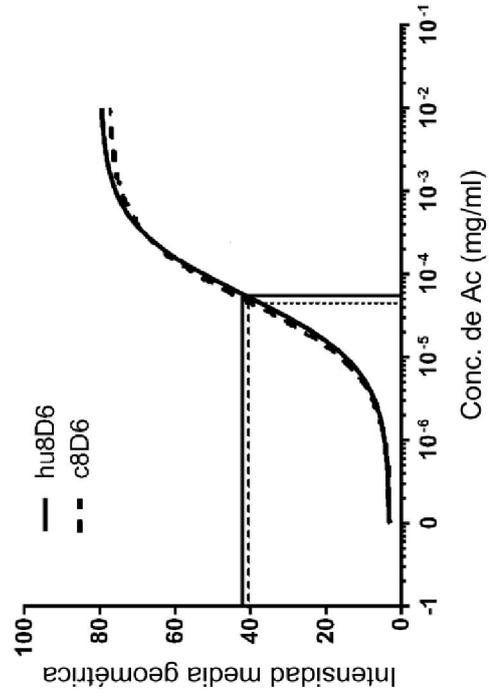


FIG. 6a

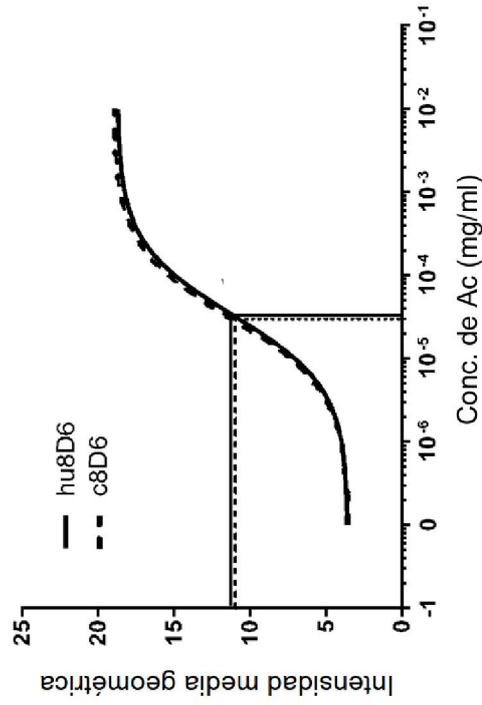


FIG. 6b

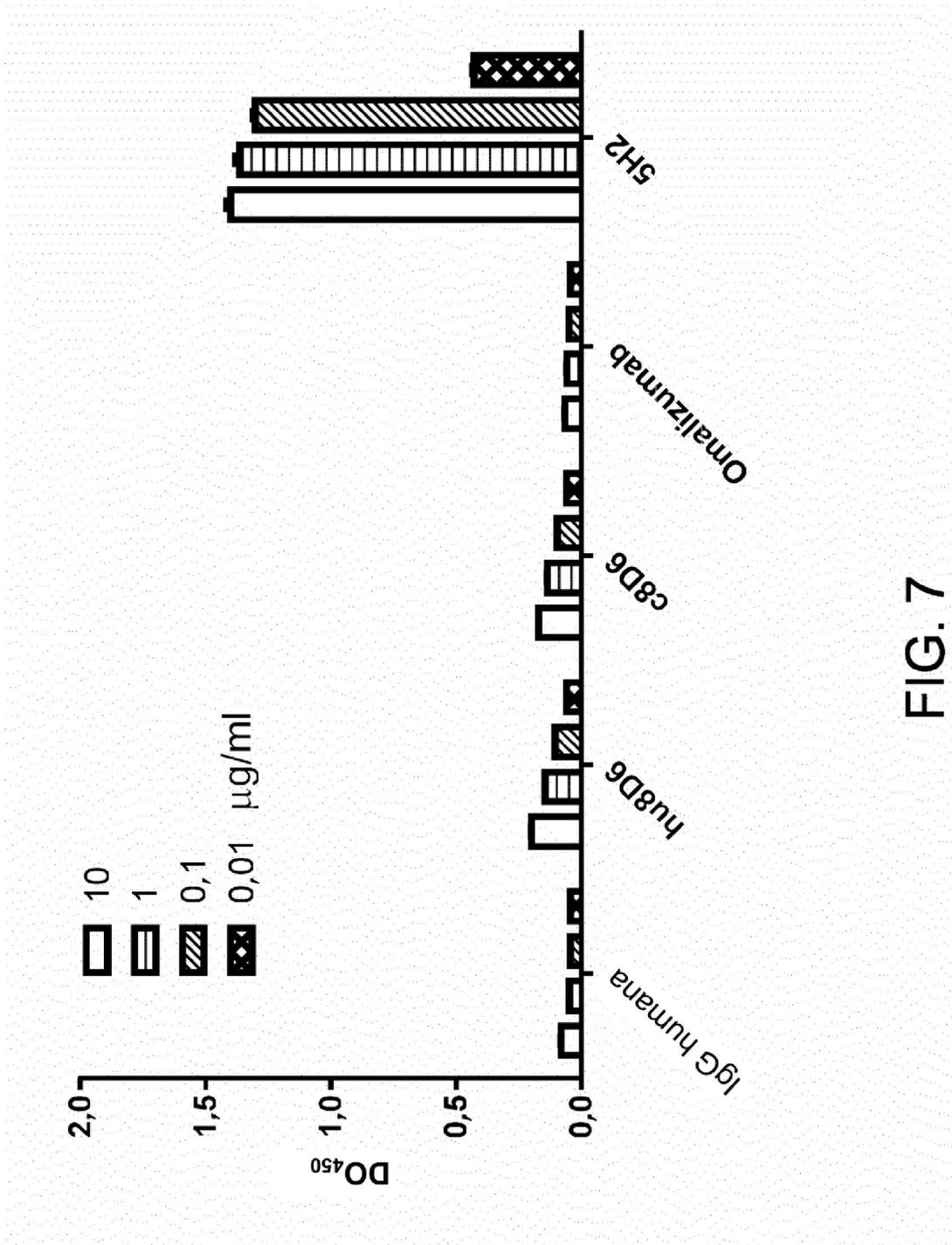


FIG. 7

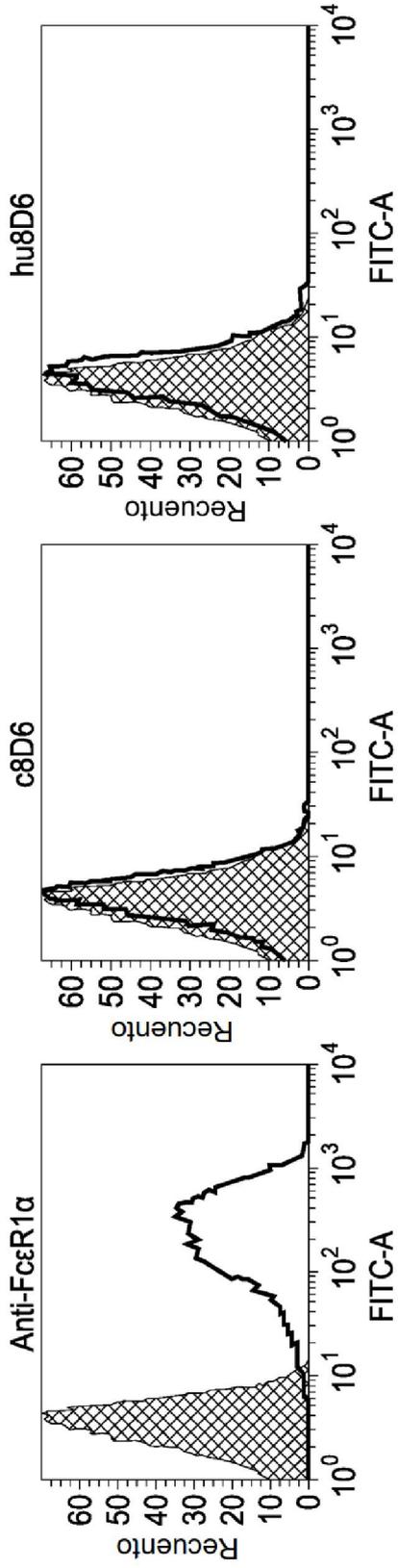


FIG. 8a

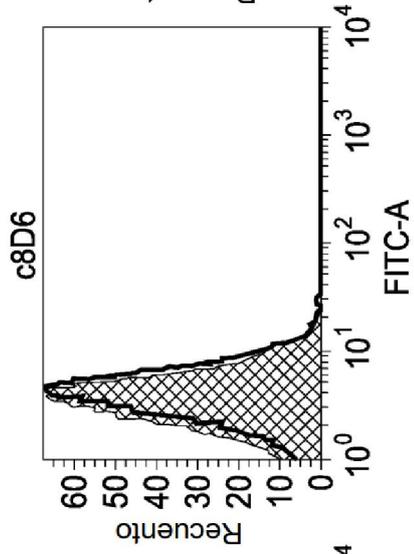


FIG. 8b

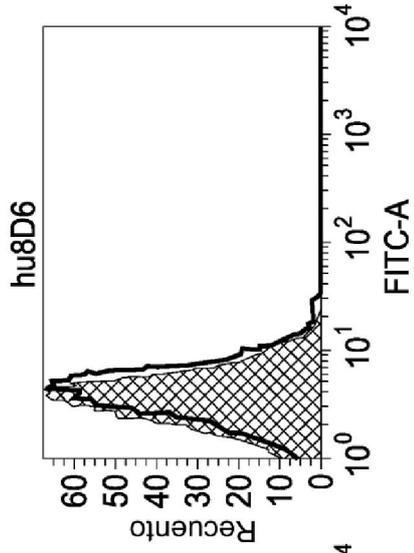


FIG. 8c

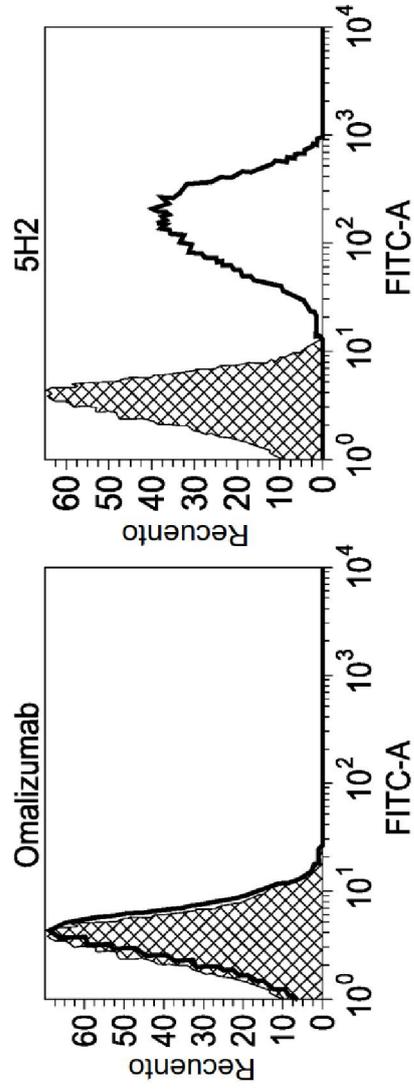


FIG. 8d

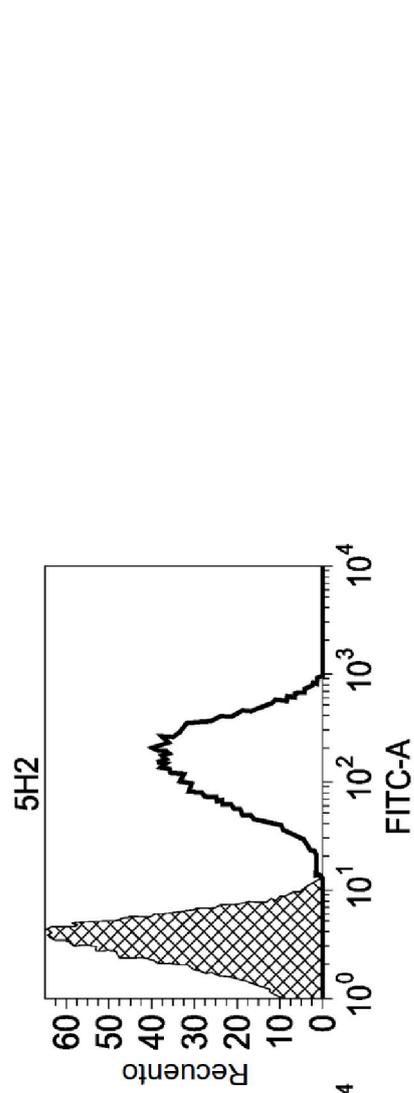


FIG. 8e

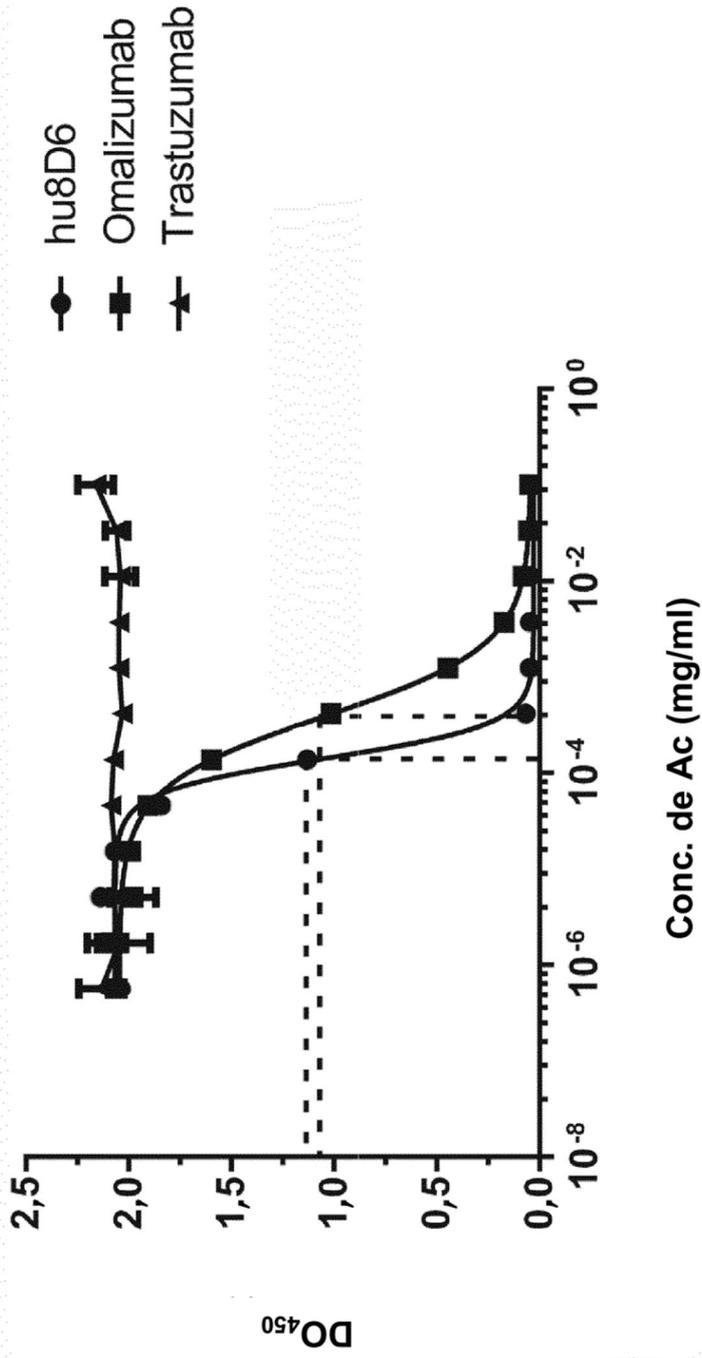


FIG. 9

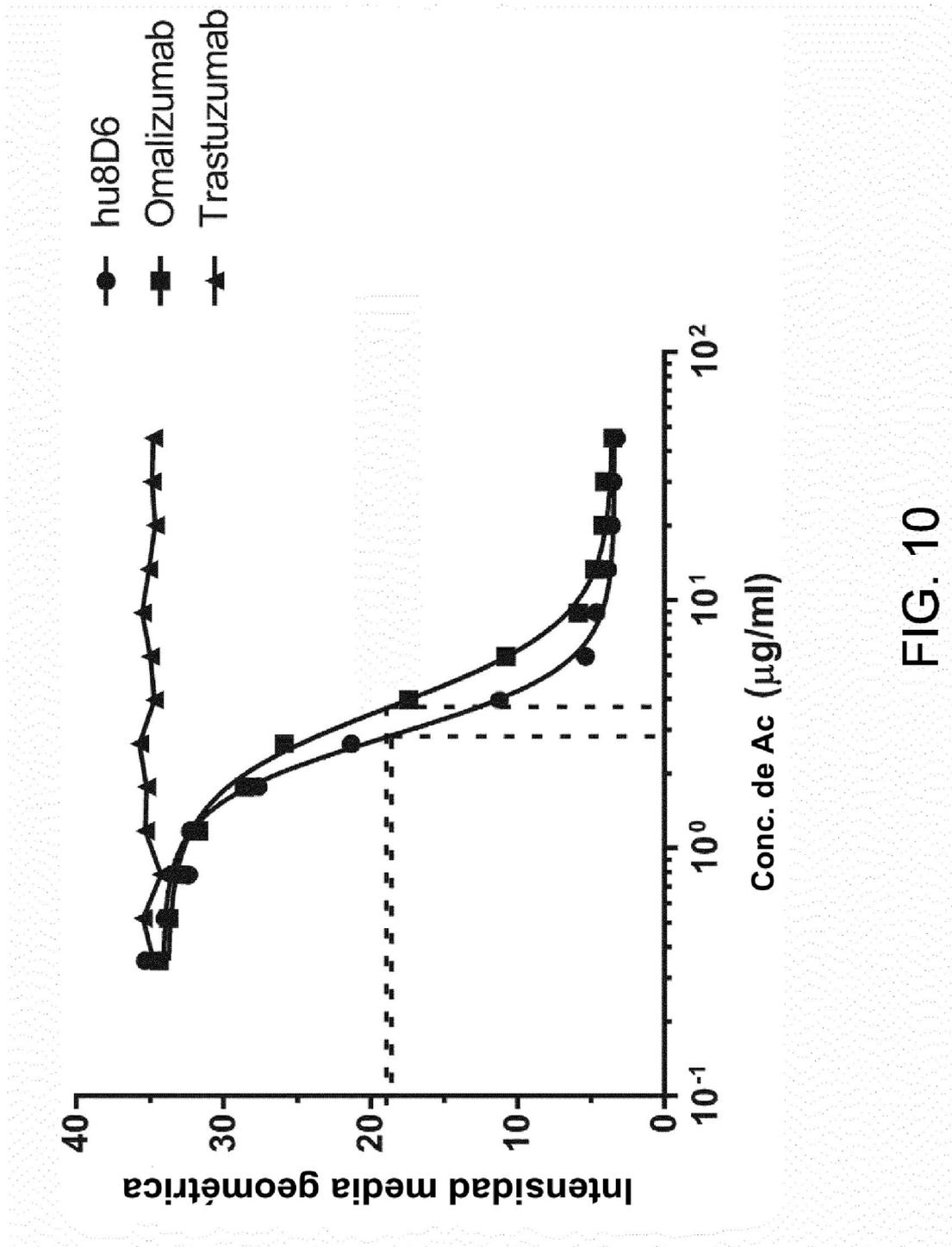


FIG. 10

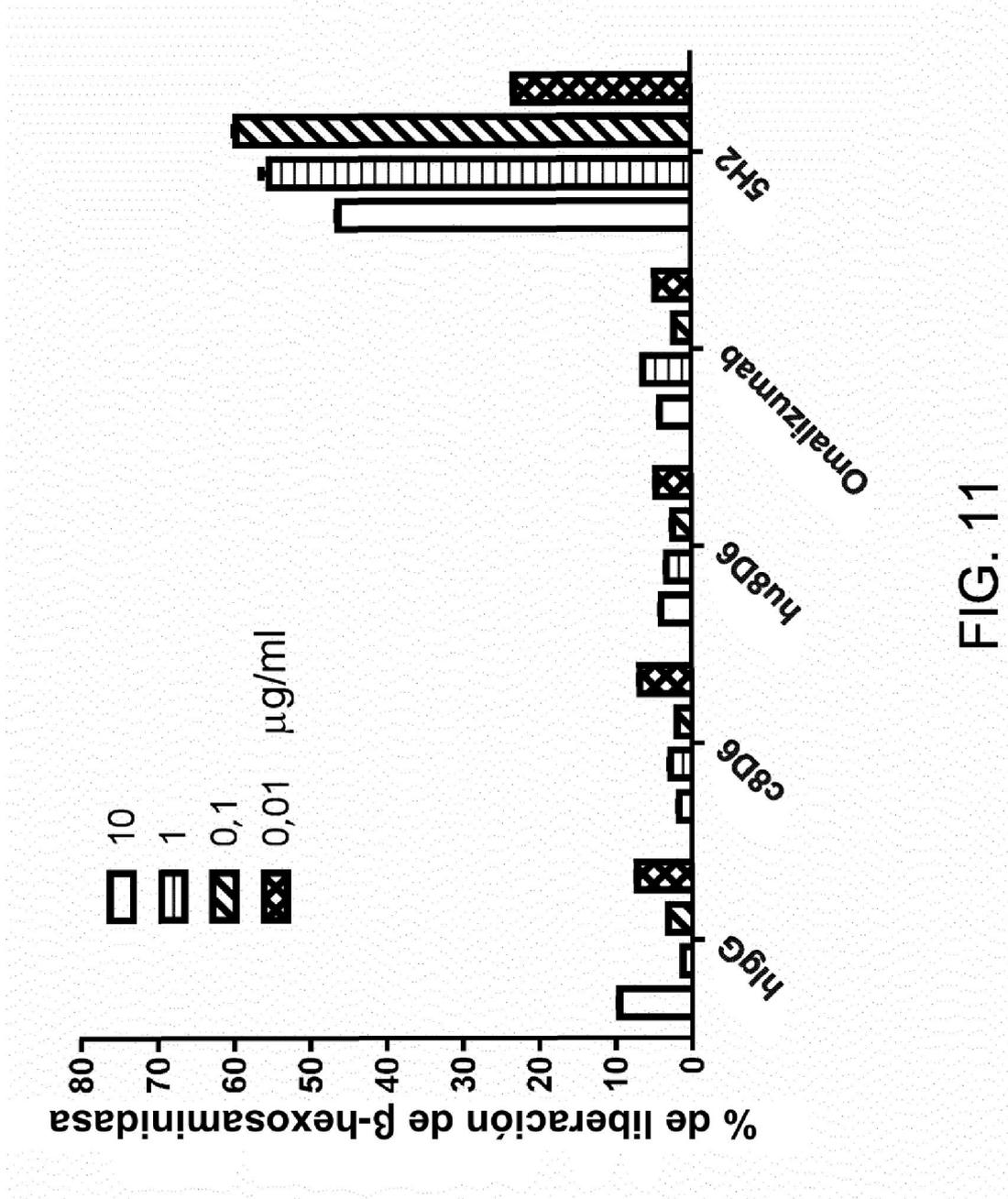


FIG. 11

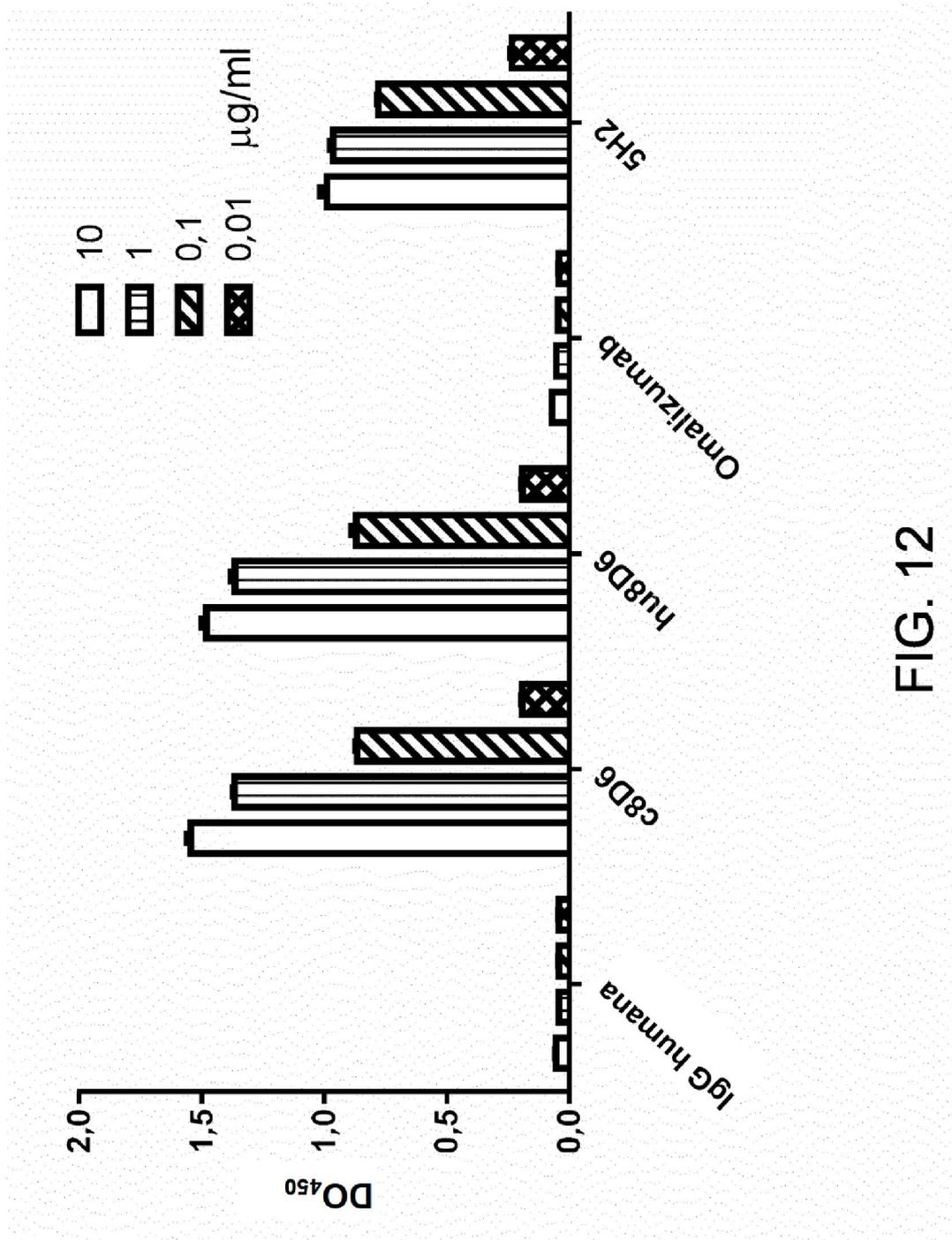


FIG. 12

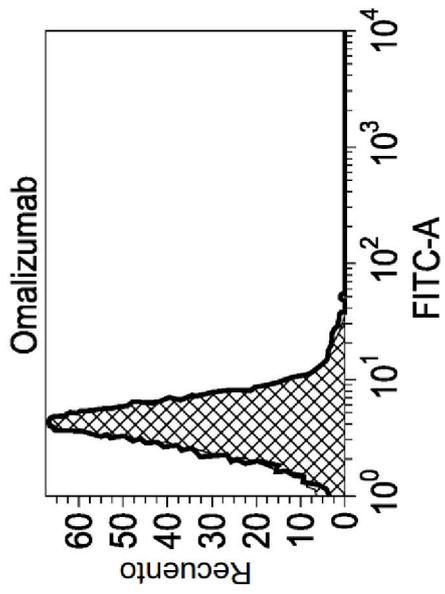


FIG. 13a

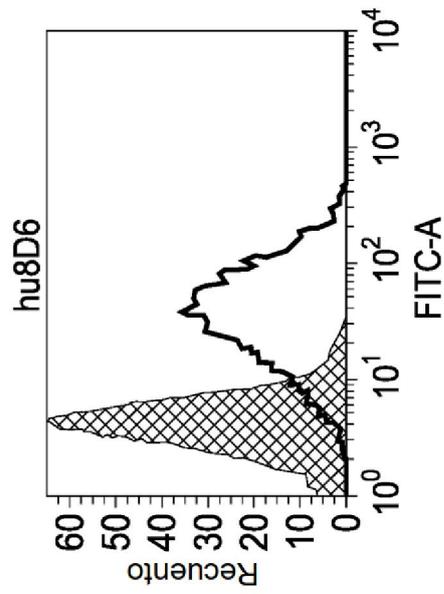


FIG. 13d

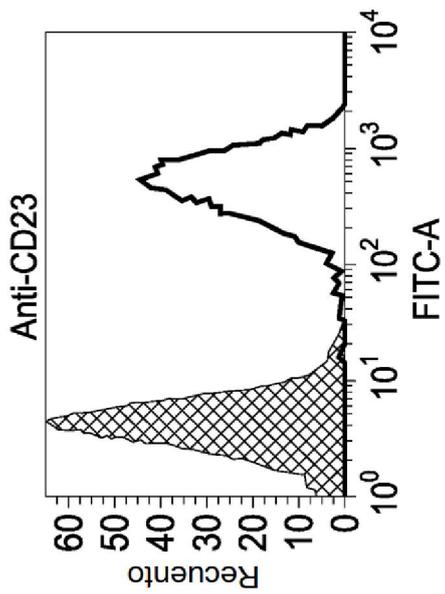


FIG. 13b

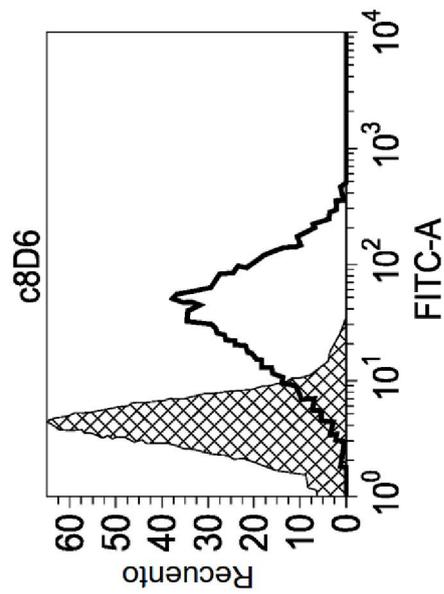


FIG. 13c

515555555555

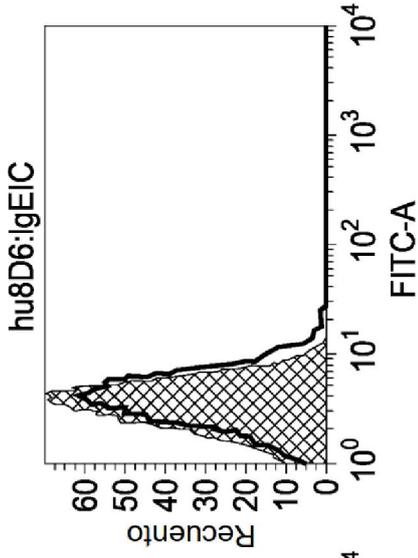


FIG. 14c

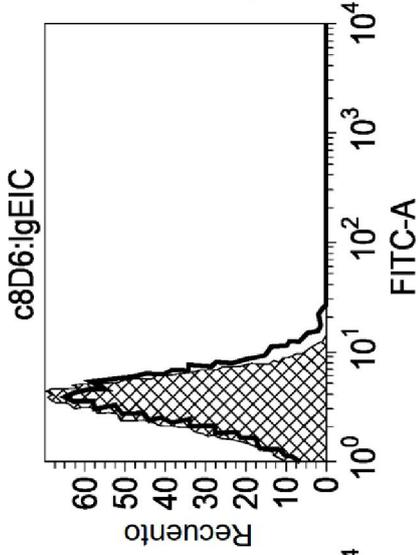


FIG. 14b

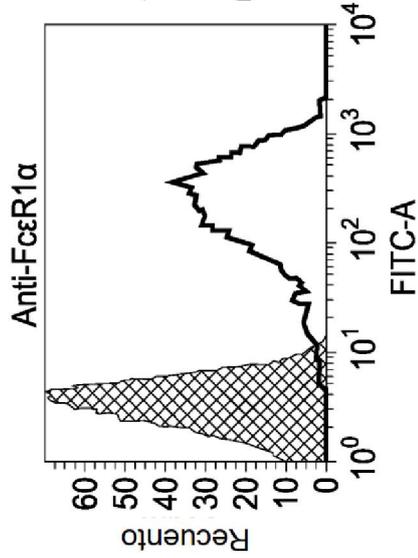


FIG. 14a

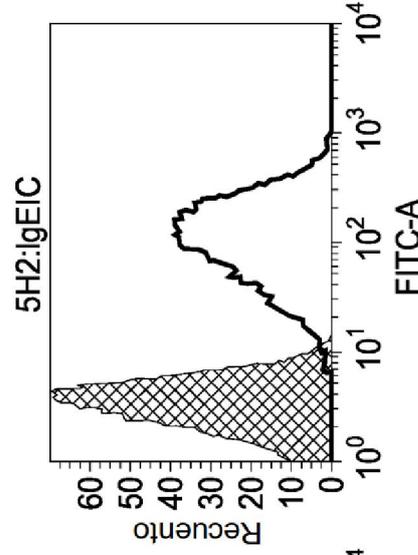


FIG. 14e

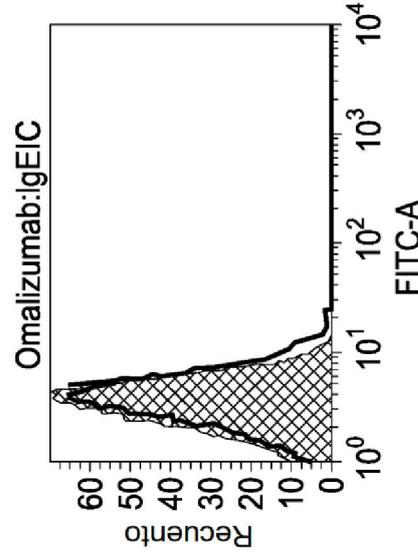


FIG. 14d

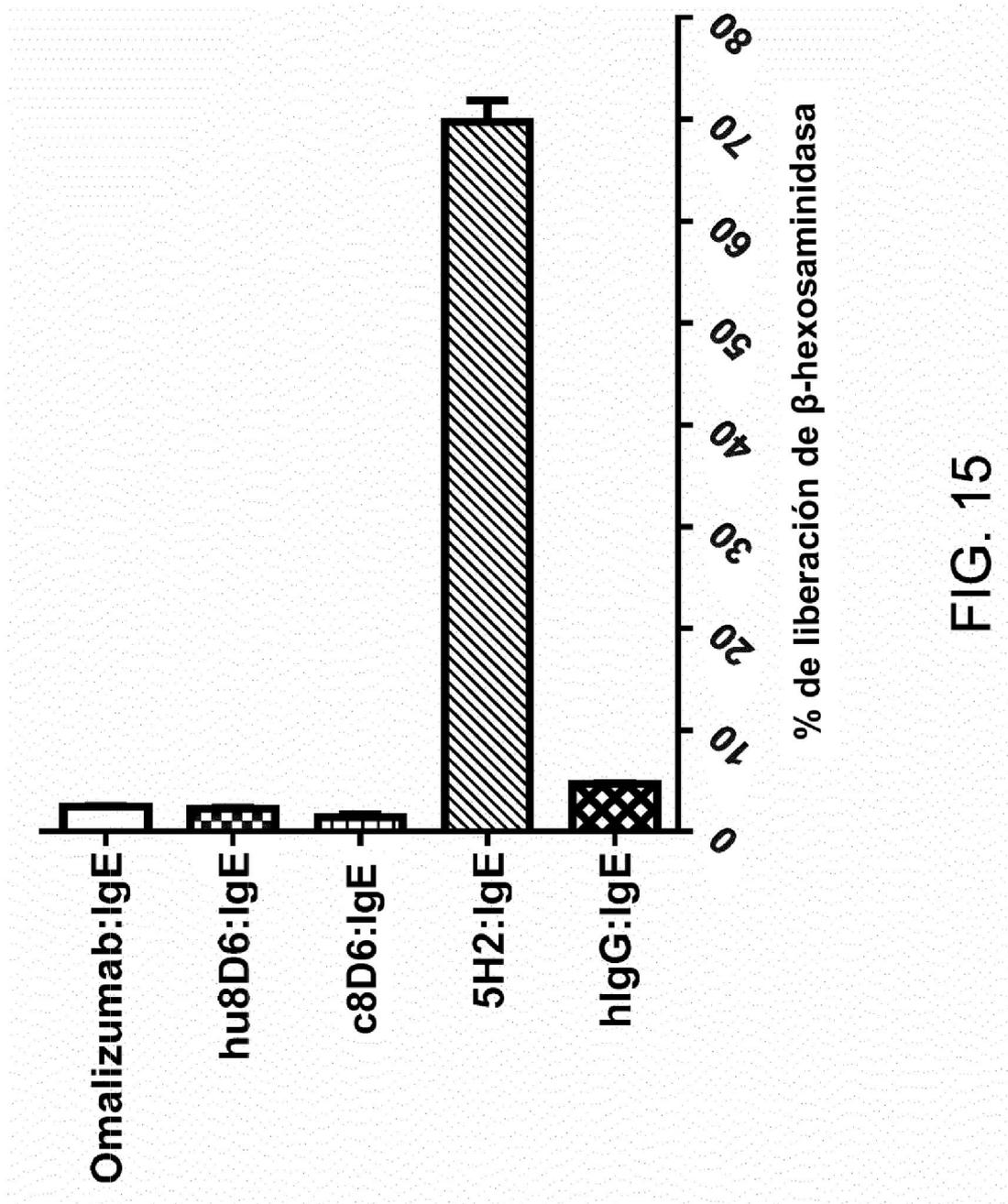


FIG. 15

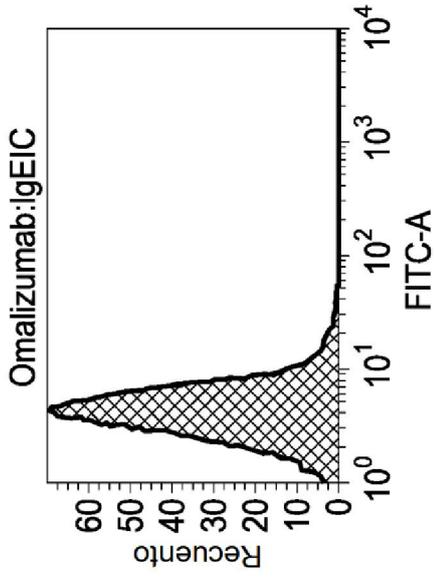


FIG. 16a

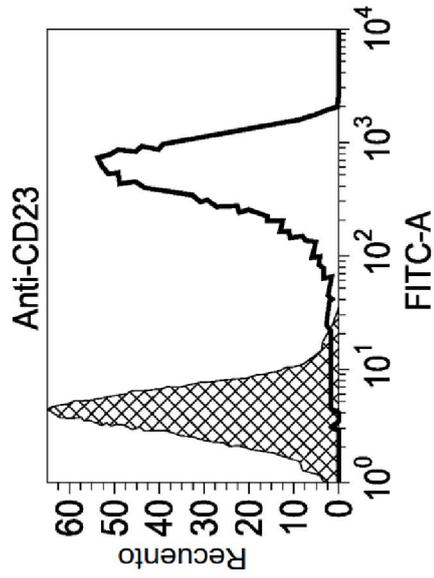


FIG. 16b

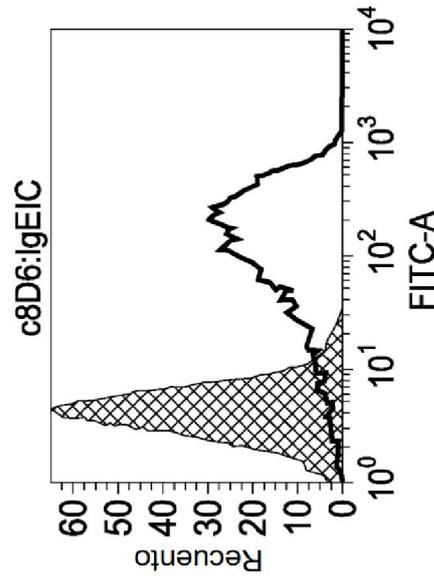


FIG. 16c

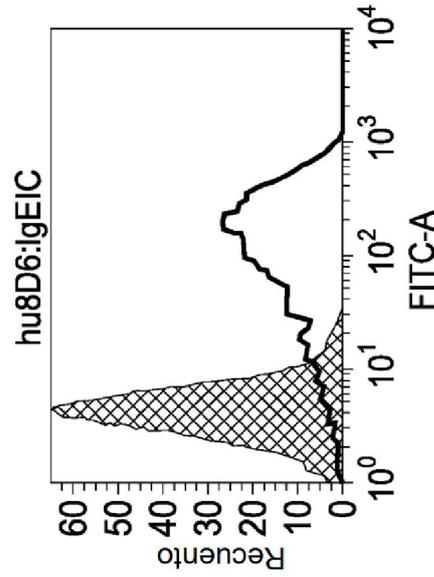


FIG. 16d

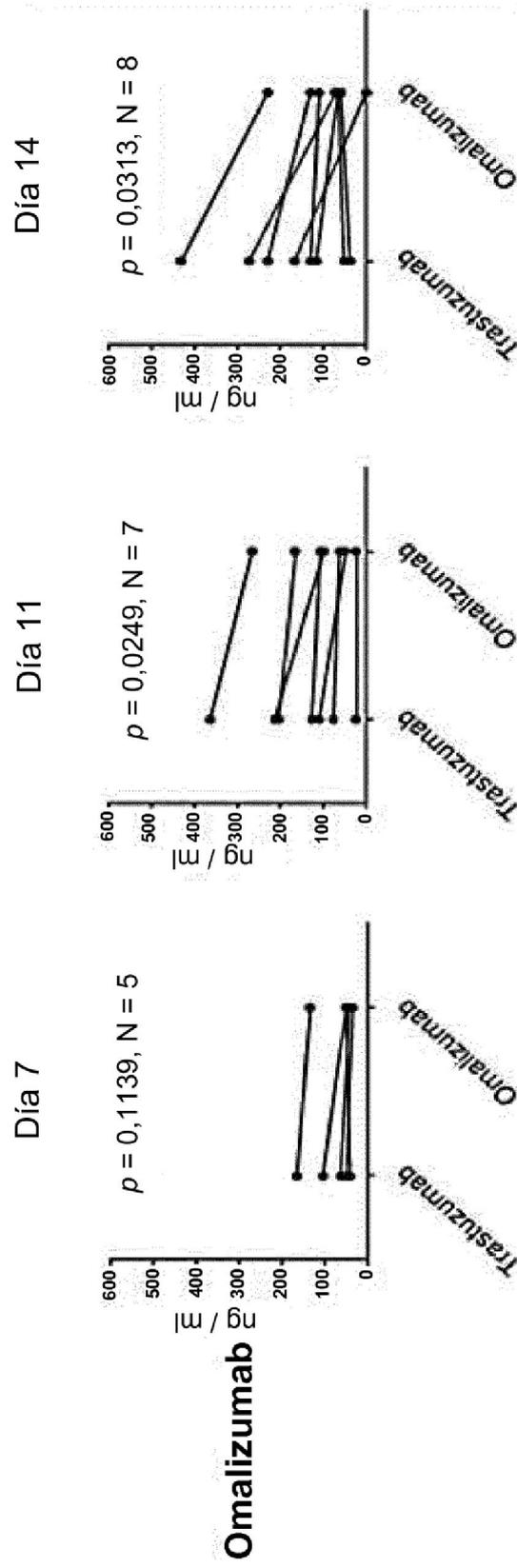


FIG. 17a

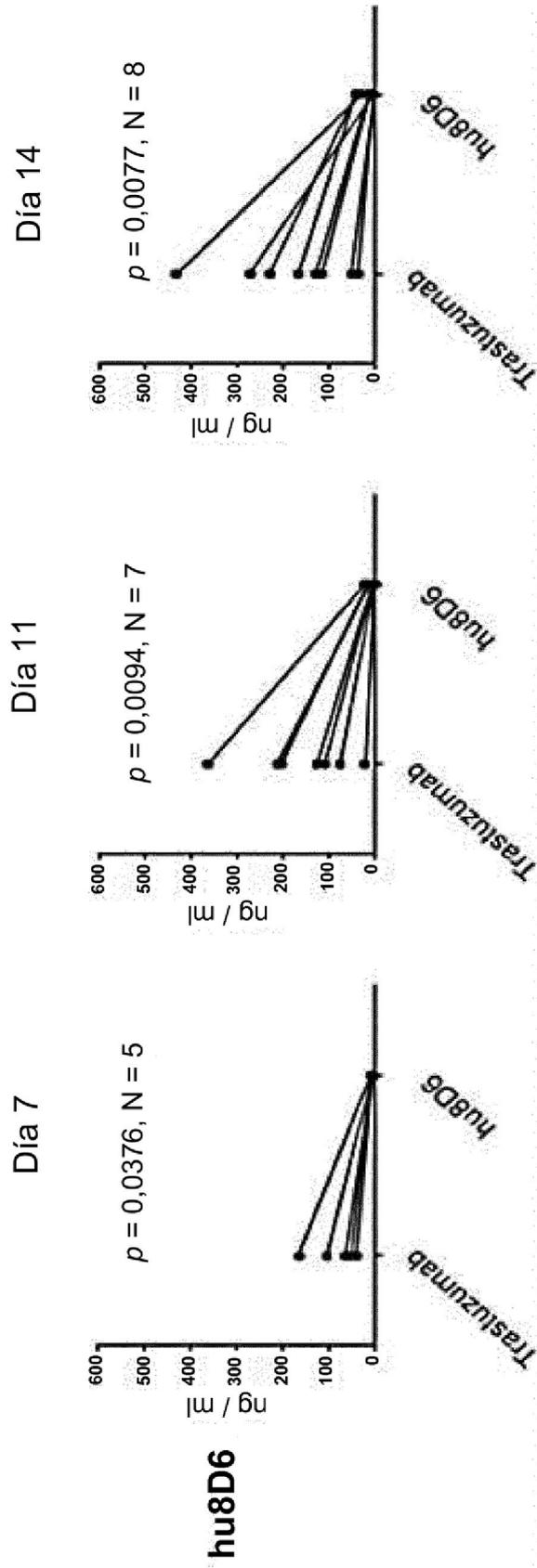


FIG. 17b