(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 296 839**

(51) Int. Cl.:
C07K 16/42 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 37/08 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **02009009 .8**
(86) Fecha de presentación : **14.08.1992**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1260521**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **27.11.2002**

(54) Título: **Variantes de inmunoglobulinas para receptores Fcϵ específicos.**

(30) Prioridad: **14.08.1991 US 744768**
07.05.1992 US 879495

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **Genentech Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(72) Inventor/es: **Jardieu, Paula M. y**
Presta, Leonard G.

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Variantes de inmunoglobulinas para receptores Fcϵ específicos.

Antecedentes de la invención

Esta invención se refiere a variantes de la secuencia de aminoácidos de anticuerpos anti-IgE, y especialmente al uso médico de anticuerpos humanizados capaces de unirse diferencialmente a FcϵRI y FcϵRII.

La IgE es un miembro de la familia inmunoglobulina que media las respuestas alérgicas tales como el asma, las alergias a alimentos, la hipersensibilidad del tipo 1, y la familiar inflamación de los senos nasales padecida de forma amplia. La IgE también se une a las células B (y a los monocitos, eosinófilos y plaquetas), a través de su región Fc, a un receptor de la IgE de baja afinidad (FcϵRII, denominado a partir de ahora "FCEL"). A partir de la exposición de un mamífero a un alérgeno, las células B se amplifican clonalmente, las cuales sintetizan IgE que se une al alérgeno. Esta IgE, a su vez, es liberada en la circulación por las células B, en donde es unida por las células B (a través del FCEL), y por los mastocitos y los basófilos a través del denominado receptor de alta afinidad (FcϵRII, denominado a partir de ahora "FCEH") que se halla sobre la superficie de los mastocitos y basófilos. Por tanto, tales mastocitos y basófilos están sensibilizados para el alérgeno. La siguiente exposición al alérgeno entrecruza el FcϵRI en estas células y activa por tanto su liberación de histamina y otros factores, los cuales son responsables de la hipersensibilidad y anafilaxis clínica.

La técnica ha informado de anticuerpos capaces de unirse a IgE unida a PCEL pero no a IgE ubicada en el FCEH (ver, por ejemplo, WO-89/06.138 y la patente estadounidense 4.940.782). Se descubre que estos anticuerpos son clínicamente ventajosos puesto que se unen a IgE que se halla sobre células B o circulando libremente en el cuerpo, pero no se unen al FCEH y, por tanto, no activarán los mastocitos o basófilos. Además, se conocen varias variantes de las secuencia de aminoácidos de las inmunoglobulinas, por ejemplo, los anticuerpos "quiméricos" y "humanizados" (ver, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.816.567; WO-91/09.968; EP-452.508; y WO-91/16.927). Los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos unidoras de antígenos), las cuales contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que se remplazan residuos de las región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos estructurales del Fv de la inmunoglobulina humana son remplazados por los residuos no humanos correspondientes. Más aún, el anticuerpo humanizado podría comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias estructurales. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más y optimizar las prestaciones del anticuerpo, como se describirá con más detalle más abajo. Son también conocidos *per se* los anticuerpos monovalentes y biespecíficos.

Se entiende generalmente que el FCEH, al igual que el FCEL, se une al (a los) sitio(s) de reconocimiento en el dominio constante (Fc) de la IgE. El (los) sitio(s) de reconocimiento para los dos receptores están pobremente definidos, a pesar del considerable esfuerzo realizado en el pasado dirigido al problema.

A lo largo de la década pasada se han realizado diversos estudios para determinar qué porción de la molécula de IgE está implicada en la unión al FcϵRI y FcϵRII. Esencialmente, se han intentado tres estrategias. Primero, se han usado péptidos correspondientes a porciones específicas de la secuencia de IgE o como inhibidores competitivos de la unión IgE-receptor (Burt *et al*., Eur. J. Immunol. 17:437-440 (1987); Helm *et al*., Nature 331:180-183 (1988); Helm *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9465-9469 (1989); Vercelli *et al*., Nature 338:649-651 (1989); Nio *et al*. Peptide Chemistry 203-208 (1990)), o para generar anticuerpos anti-IgE que bloquearían la interacción IgE-receptor (Burt *et al*., Molec. Immunol. 24:379-389 (1987); Robertson *et al*., Molec. Immun. 25:103-113 (1988); Baniyash *et al*., Molec. Immun. 25:705-711 (1988)). El péptido más efectivo como inhibidor competitivo era una secuencia que era 1000 veces menos activa que la IgE (Burt *et al*., Eur. J. Immunol. 17:437-440 (1987)).

Helm *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9465-9469 (1989) halló que un péptido correspondiente a los residuos 329-340 de IgE bloqueaba la sensibilización *in vivo* de granulocitos basófilos humanos con anticuerpos IgE humanos. Estudios ulteriores indicaron que los residuos 3959-409 no eran esenciales para la unión del péptido 329-409 al FcϵRI (Helm *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. 86:9465-9469 (1989)). Hay que destacar que las variantes de la secuencia de IgE descritas más abajo tenían la secuencia de Padlan *et al*., Mol. Immun. 23:1063 (1986), pero que los números de los residuos de inmunoglobulina usada en la presente invención son aquéllos de Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interes (National Institutes of Health, Bethesda, Md, 1987).

Vercelli *et al*., Nature 338:649-651 (1989) usó péptidos de IgE recombinantes, así como anticuerpos monoclonales anti-Fcϵ, para investigar el sitio de unión de la IgE humana de las células B (FcϵRII). Ellos concluyeron que el sitio de unión FcϵRII está en Fcϵ3 cerca de K339-V402.

Burt *et al*., Eur. J. Immun. 17:437-440 (1987) investigaron siete péptidos por su competición frente a la IgE de rata en la unión a mastocitos de ratas. Su péptido más activo, el p129, era 1000 veces menos activo que la IgE. El p129 corresponde a la secuencia humana 439-453, la cual incluye el bucle EF. Otro de sus péptidos, el p130, correspondiente a los residuos 396-419 en el dominio Fcϵ3, no tenía actividad.

Robertson *et al*., Molec. Immun. 25:103-113 (1988) verificó la unión de la IgE mediante anticuerpos dirigidos contra secuencias inducidos por varios péptidos sintéticos. Ellos concluyeron que la secuencia definida por su ϵ-péptido-4 (correspondiente a los residuos 446-460) no estaba significativamente implicada en la unión al receptor, mientras que la secuencia definida por su ϵ-péptido-3 (correspondiente a los residuos 387-401) era probable que estuviera cercana al sitio de reconocimiento del receptor de la IgE.

Nio *et al*., Peptide Chemistry 203-208 (1990) evaluaron numerosos péptidos con respecto a su capacidad para inhibir la liberación de histamina por parte de basófilos humanos *in vivo*. Sólo un péptido (péptido 2, Tabla 1) mostró una inhibición específica; este péptido abarcaba los residuos 376-388. No obstante, un péptido mayor que incorporaba esta secuencia (péptido 3, Tabla 1) no tenía actividad inhibidora.

En segundo lugar se han explorado parcialmente las mutaciones de la IgE. Schwarzbaum *et al*., Eur. J. Immun. 19:1015-1023 (1989) (ver más arriba) encontraron que un mutante puntual P404H (P442H según el sistema de numeración usado en la presente invención) había reducido 2 veces la afinidad por el FcϵRI sobre células de leucemia basofílica de rata (RBL), pero la interpretación de este hallazgo es controvertida (Weetall *et al*., J. Immunol. 145:3849-3854 (1990)).

En tercer lugar han construido moléculas quiméricas. La IgE humana no se une al receptor de ratón (Kulczycki Jr. *et al*., J. Exp. Med. 139:600-616 (1974)), mientras que la IgE de roedor se une al receptor humano con una afinidad reducida (Conrad *et al*., J. Immun. 130:327-333 (1983)); la IgG1 humana no se une a los receptores de la IgE (Weetall *et al*., J. Immun. 145:3849-3854 (1990)). En base a estas observaciones, varios grupos han construido quimeras humanas-de ratón o quimeras IgE-IgG humanas. Weetall *et al*., J. Immun. 145:3849-3854 (1990), construyó una serie de quimeras IgG1 humana-IgE de ratón, y concluyó que los dominios Fcϵ2 y Fcϵ3 están implicados en la unión al FcϵRI de ratón, mientras que es improbable que el dominio Fcϵ4 esté implicado en la unión al FcϵRI de ratón (pero posiblemente podría estar implicado en la unión al FcϵRII). No obstante, estas conclusiones son inciertas puesto que se basan principalmente en la *ausencia* de unión por parte de quimeras, y tres de las cinco quimeras carecían de ciertos puentes disulfuro entre cadenas.

Nissim *et al*., EMBO J. 10:101-107 (1991) construyeron una serie de quimeras de IgE humana-de ratón y midieron la unión a células RBL, y concluyeron que la porción de IgE que se une con elevada afinidad al receptor Fcϵ especializado sobre células RBL podría ser asignado al Fcϵ3.

Los resultados informados por estos autores (por ejemplo, Helm *et al*. y Burt *et al*.) son inconsistentes. Más aún, en el caso de anticuerpos anti-IgE es difícil eliminar la posibilidad de bloqueo no específico debido a impedimento estérico (Schwarzbaum *et al*., Eur. J. Immun. 19:1015-1023 (1989)). Es evidente que existe una confusión considerable en la técnica respecto a los dominios del Fc de IgE que están implicados en la unión de la IgE al FCEH o en el mantenimiento de la conformación de la IgE responsable de la unión de la IgE al FCEH.

Resumen de la invención

De forma amplia, la presente invención de refiere a anticuerpos que son capaces de unirse al FcϵRII unido a IgE, pero que son sustancialmente incapaces de unirse al FcϵRI unido a IgE, y a su uso en terapias, y a su uso para la preparación de medicamentos para el tratamiento o profilaxis de alergias.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo, que es capaz de unirse a FcϵRII-IgE unida pero es sustancialmente incapaz de unirse a FcϵRI-IgE unida, que comprende un anticuerpo contra un receptor humano en el que se han sustituido, en una o más de las posiciones 30, 30b, 30d, 33, 53, 91, 92, 93 y 94 en la cadena ligera y en las posiciones 27, 28, 29, 29a, 31, 33, 34, 50, 52, 53, 54, 55, 58, 95, 97, 98, 99, 100 y 101 en la cadena pesada, residuos procedentes de posiciones análogas en el anticuerpo donante MAE11, MAE13 o MAE15, que tienen las secuencias de aminoácidos de la s cadenas ligera y pesada detalladas en la SEC. ID. Nº 2 a 7, o un anticuerpo donante que tiene las características poseídas por el anticuerpo MAE11, en particular la unión a IgE soluble, la unión a células B portadores de IgE, el bloqueo de la unión de IgE al FcϵRI y FcϵRII, la inhibición de la producción de IgE *in vitro*, y la incapacidad de unirse a basófilos recubiertos con IgE, para su uso en terapias.

Una realización preferida es un anticuerpo que comprende las secuencias de la cadena pesada y ligera del humae11ver.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7a, 8, 8a, 8b o 9, en donde humae11ver.1 tiene las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera tal como se detalla en SEC. ID. Nº: 8 y 9, y humae11ver.2-9 tienen las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del humae11ver.1, incorporando además las modificaciones mostradas en la Tabla 5.

Otra realización preferida es un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del humae11ver.1 tal como se detallan en las SEC. ID. Nº: 8 y 9, estando sustituida dicha secuencia de cadena pesada en la posición 60 con asparagina, en la posición 61 con prolina, y en la posición 67 con isoleucina.

Los polipéptidos que se unen diferencialmente de esta invención son útiles en procedimientos de diagnóstico para los receptores de la IgE, o en la terapia de desórdenes mediados por la IgE tales como las alergias. Son útiles también para preparar anticuerpos capaces de unirse a regiones de la IgE que participan en la unión al receptor.

En una realización de esta invención, se proporcionan variantes de anticuerpos anti-IgE para su uso en la diagnosis o para la terapia o profilaxis de alergias u otros desórdenes mediados por la IgE. En realizaciones concretas de esta invención se proporcionan variantes de anticuerpos anti-IgE en las que uno o más residuos de la cadena ligera (receptora) humana 4, 13, 19, 24, 29, 30, 33, 55, 57, 58, 78, 93, 94, ó 104, o los residuos de la cadena pesada 24, 37, 48, 49, 54, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 69, 78, 82, 97 ó 100, han sido modificados, preferiblemente mediante sustitución con el residuo hallado en la posición correspondiente en el anticuerpo donante (generalmente de ratón). En las realizaciones preferidas, los residuos seleccionados son el 13, 19, 58, 78 ó 104 de la cadena ligera, o los residuos 48, 49, 60, 61, 63, 67, 69, 82 u 82c en la cadena pesada, y más preferiblemente los residuos 60, 61 de la cadena pesada o el residuo 78 de la cadena ligera.

En otras realizaciones proporcionamos anticuerpos que son capaces de unirse al FCEL unido a IgE, pero que son sustancialmente incapaces de unirse al FCEH unido a IgE o de inducir la liberación de histamina a partir de mastocitos o basófilos, que comprenden el dominio CDR de Kabat en el que se ha sustituido un residuo en posición análoga procedente de un dominio CDR de Kabat de los anticuerpos de ratón anti-huIgE MAE11, MAE13, MAE15 o MAE17. También se proporcionan en la presente invención anticuerpos biespecíficos y anticuerpos monovalentes de IgE; y anticuerpos humanizados que presentan una afinidad por la IgE que en el rango desde aproximadamente 0,1 hasta 100 veces la del MAE11.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 ilustra la secuencia del Fcϵ2 y Fcϵ3 de la IgE humana (SEC. ID. Nº 1). Esta secuencia concreta procede de Padlan *et al*., Molec. Immun. 23:1063-1075 (1986). Los residuos se numeran de acuerdo con Kabat (ver más arriba). Los residuos "X" se incluyen para alinear la secuencia de IgE de Padlan con el esquema de numeración de Kabat. Las secuencias que se alteraron al preparar varios mutantes de la IgE están subrayadas; los números en negrita debajo de las líneas denotas el número del mutante. Los residuos de la hoja-β están rayados por encima; los residuos del bucle están definidos por todos los residuos que intervienen entre la dos hojas-β.

La Figura 2 ilustra las secuencias de la cadena ligera y pesada del MAE11 (SEC. ID. Nº 2 y 3), MAE13 (SEC. ID. Nº 4 y 5) y MAE15 (SEC. ID. Nº 6 y 7).

La Figura 3 ilustra las secuencias de la cadena ligera y pesada del HuMae11V1 (SEC. ID. Nº 8 y 9).

Las Figuras 4a y 4b ilustran respectivamente el porcentaje de inhibición de la unión de la IgE a los receptores FCEL y FCEH por parte del anticuerpo monoclonal de ratón MAE11 así como por 3 variantes humanizadas (v1, v8 y v9).

Las Figuras 5a-5d comparan la unión de los anticuerpos MAE11, MAE15 y MAE17 a diversas variantes de la huIgE. MAE1 se proporciona como un control que se une a ambas, las células B y los mastocitos unidos a IgE. Los mutantes programados en los recuadros de cada figura se identifican en la Tabla 11.

Descripción detallada de la invención

Los polipéptidos análogos de la IgE de esta invención contienen una secuencia de aminoácidos que es homóloga a la de la IgE que ocurre de forma natural, y tienen la capacidad de unirse específica o diferencialmente al FCEL o FCEH, pero, en diversos grados, no a ambos. El grado de homología de tales polipéptidos con la IgE del tipo salvaje no es crítico, puesto que tan sólo es preciso retener suficiente secuencia de IgE para permitir que la IgE se una diferencial y específicamente a uno de los dos receptores. En general, los polipéptidos de esta invención serán análogos Fc de IgE, y serán desde aproximadamente el 80% al 99% homólogos con una secuencia polipeptídica de una región Fc de cadena pesada de una IgE que ocurra de forma natural. La homología se determina mediante procedimientos convencionales en los que todas las sustituciones se consideran que no son homólogas (tanto si son conservadoras o no conservadoras), y en los que las secuencias se alinean para conseguir la máxima homología.

Se entenderá que los números de los residuos de Fc de IgE referidos en la presente invención son aquéllos de Kabat. Al aplicar las enseñanzas de los residuos de esta invención a otros dominios Fc de la IgE, será necesario comparar la secuencia candidata completa con la secuencia de la Figura 1 con objeto de alinear los residuos y correlacionar los números de los residuos. Además, la identidad de ciertos residuos individuales en cualquier sitio con número de Kabat podría variar de IgE a IgE debido a divergencias entre especies o alélicas. Cuando, por ejemplo, se afirma que las sustituciones se introducen en el residuo R383 (IgE humana), se entenderá que esto significa introducir una sustitución en el mismo sitio en la IgE, incluso si este mismo sito (en el bucle AB) pudiera estar ubicado en un residuo con número diferente, o pudiera estar representado en la IgE progenitora o inicial por un residuo que es diferente al descrito por Kabat. No obstante, en consideración a la claridad y simplicidad, en la presente invención se usarán los números de los residuos y las identidades de las secuencias de las cadenas pesadas de IgE de Kabat. Hay que destacar que algunos residuos de Kabat se suprimieron en la secuencia de Padlan, en cuyo caso se mantiene el sistema de numeración de Kabat mediante la inserción de un residuo espaciador denominado "X" (Ver Figura 1).

De forma similar, el sistema Kabat se usa para designar residuos de inmunoglobulina usados en la preparación de variantes de inmunoglobulinas, por ejemplo humanizadas, anti-IgE, tales como IgG, IgE, IgA o IgD. En las realizaciones preferidas, el sitio de la inmunoglobulina humana receptora se numera de acuerdo con las secuencias de

los subgrupos III (V_H) consenso de Kabat y subgrupos I (V_L) consenso de κ. Con objeto de determinar que residuos donantes corresponden a aquéllos residuos consenso de Kabat, las secuencias se alinean al máximo, introduciendo huecos según sea necesario, usando los residuos de cisteína del dominio variable como postes de guía principales. Hay que destacar que los CDR varían considerablemente de anticuerpo a anticuerpo (y, por definición, no presentarán homología con las secuencias consenso de Kabat). El alineamiento máximo de los residuos estructurales (particularmente las cisteínas) frecuentemente requerirá la inserción de residuos "espaciadores" en el sistema de numeración a ser usado para la región F_v del anticuerpo donante. Por ejemplo, el residuo "29a" al que se refiere más adelante. Éste representa un residuo extra hallado en la CDR V_{H1} del anticuerpo donante de ratón, para el cual no existe una contrapartida en la secuencia consenso, pero cuya inserción es necesaria para obtener el alineamiento máximo de las secuencias consenso y donante. En la práctica, por tanto, cuando se prepare un anticuerpo humanizado (versión 1) a partir de este donante, contendrá la V_{H1} con el residuo 29a.

Los polipéptidos con unión diferencial de esta invención típicamente contienen aproximadamente desde 5 a 250 residuos, los cuales son homólogos con una región Fc de la cadena pesada de una IgE, pero ordinariamente contendrán aproximadamente desde 10 hasta 100 de tales residuos. Usualmente, las regiones Fc3 y Fc4 de IgE estarán presentes, proporcionando el dominio Fc3 los residuos directamente implicados en la unión al receptor, y estando presente la Fc4 para garantizar la integridad conformacional.

Generalmente, la IgE es IgE humana, aunque también se incluyen las IgE de animales, como la IgE de rata, de ratón, equina, bovina, felina o porcina. Tal como se ha mencionado más arriba, habrá una variación en las identidades y los números de los residuos para estas IgE en comparación con la secuencia de la Figura 1.

El FCEH y el FCEL se definen respectivamente como el receptor de alta afinidad de la IgE (FCϵRI, Ishizaka *et al*., Immunochemistry 7:687-702 (1983)) hallados en mastocitos o en basófilos, y el receptor de baja afinidad (FCϵRII o CD23) hallados sobre células implicadas en la inflamación, tales como monocitos, eosinófilos y plaquetas, así como sobre células B (Capron *et al*., Immun. Today 7:15-18 (1986)). El FCEH y el FCEL incluyen alelos y variantes de la secuencia predeterminada de los mismos que unen la IgE. Mientras que el FCEH contiene varias cadenas polipeptídicas, la unión de polipéptidos candidatos a sus cadenas alfa es todo lo que se tiene que ensayar, puesto que la cadena alfa es la porción del FCEH que une la IgE.

Unión diferencial significa que el polipéptido se unirá a uno del FCEL o FCEH hasta el alcance de al menos aproximadamente el 75% del grado con el que la IgE nativa homóloga se une a ese receptor, pero no se unirá al otro receptor a más de aproximadamente el 20% del grado con el que la IgE homóloga se une al otro receptor. La unión se determinante mediante los ensayos del Ejemplo 3. En esta invención se incluyen polipéptidos que son capaces de unirse a uno de los dos receptores con un grado mayor al de la IgE nativa.

Variantes de anticuerpos anti-huIgE

Se produjeron variantes de anticuerpos anti-huIgE obteniendo primero un grupo de anticuerpos monoclonales de ratón que eran capaces de unirse al FCEL pero no al FCEH. 8 de tales anticuerpos monoclonales de ratón, denominados MAE10, MAE11, MAE12, MAE13, MAE14, MAE15, MAE16, y MAE17, se obtuvieron mediante procedimientos convencionales que implicaban inmunizar ratones con IgE humana o un polipéptido consistente en los residuos 315-547 de la huIgE, y examinándolos en busca de actividad anti-IgE.

MAE11/15 y MAE13 reconocen epítopos diferentes. Parece ser que el epítopo para MAE13 está ubicado tridimensionalmente adyacente a un componente clave del sitio de unión para el FCEH de la IgE (pero que no ocupa directamente ese sitio) puesto que ocurrirá una ligera cantidad de liberación de histamina a concentraciones elevadas de MAE13, sugiriendo que con MAE13 ocurre cierto entrecruzamiento del FCEH mediado por anticuerpo. MAE17 fue el más efectivo para suprimir la síntesis de IgE por parte de las células B, a pesar del hecho que MAE11 y MAE13 presentaban una mayor afinidad por la IgE. Esto podría atribuirse a su capacidad para mediar la fijación del complemento (posee un isótopo de IgG2a, conteniendo, por tanto, un Fc capaz de provocar la función efectora).

Se cree que MAE11 y MAE15 reconocen el mismo epítopo de la IgE. Cada anticuerpo compartía ciertas características inusuales en su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, los CDR1 de la cadena ligera contenían cada uno 3 residuos de ácido aspártico. Los CDR3 de las cadenas pesadas de MAE11 y MAE15 contenían 3 residuos de histidina (y contenían respectivamente dos residuos de arginina).

Los anticuerpos como los anteriores poseedores de la características de unión de IgE deseadas podrían modificarse aún más. Tales modificaciones caen dentro de dos clases generales. En la primera clase, los anticuerpos son modificados de forma que son monovalentes para la IgE. Esto quiere decir que sólo un "brazo" del anticuerpo, es decir, una horquilla de cadena ligera-pesada, debería ser capaz de unir la IgE. El "brazo" Fv restante del anticuerpo (o brazos en el caso de la IgM) es específico para un segundo antígeno (que no es IgE), no es capaz de unir antígeno alguno, o se suprime totalmente. Por tanto, el término monovalente para la IgE incluye los anticuerpos polivalentes que son monovalentes para la IgE. Los mejores resultados podrían obtenerse con la segunda alternativa, puesto que esto preservaría más fielmente la estructura del anticuerpo, y conferiría posiblemente la vida media circulante más larga del anticuerpo. Los anticuerpos monovalentes para la IgE específicos para IgE unida a FCEL óptimamente comprenderán suficientes dominios Fc de las cadenas pesadas para ser capaces de la funciones de unión del complemento y efectora de Ig.

El segundo antígeno reconocido por una realización del anticuerpo monovalente para la IgE es uno que, cuando se entrecruce indirectamente con el FCEL, mediante el anticuerpo en la presente invención, no producirá ninguna respuesta tóxica o perjudicial, es decir, el segundo antígeno no es el FCEH, y generalmente es uno que no se halla en el animal a ser tratado (con objeto de evitar la absorción no deseada del anticuerpo sobre tejidos o proteínas dentro del cuerpo). Por tanto, el segundo antígeno ordinariamente no será (pero podría serlo) el FCEL. No obstante, en ciertas circunstancias, el segundo antígeno será una proteína presente en el paciente a ser tratado, por ejemplo, cuando tales proteínas han de servir como portadores o liberadora de depósitos para los anticuerpos terapéuticos en la presente invención.

Tales anticuerpos monovalentes para la IgE se preparan mediante procedimientos conocidos *per se*. Por ejemplo, el ADN que codifica las cadenas ligera y pesada del Fv de IgE se liga con ADN que codifica la Fc de un anticuerpo receptor humano. Además, se proporciona el ADN que codifica las cadenas ligera y pesada para un anticuerpo capaz de unir un segundo antígeno o un antígeno no identificado, o que codifica cadena ligera o pesada que tiene suficientes residuos suprimidos de los CDR como para que ya no pueda darse la unión de antígeno que no es IgE. Se transforma un huésped recombinante convencional con la totalidad de los cuatro ADN y se recuperan los productos. Asumiendo un surtido aleatorio de cadenas, una subpoblación de productos del anticuerpo contendrá un brazo con la cadena pesada y ligera de IgE y, al menos otro brazo que tendrá especificidad por el segundo antígeno o por ningún antígeno. La subpoblación deseada se purifica a continuación mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, absorción por inmunoafinidad o mediante cribado molecular. Estos anticuerpos también pueden prepararse mediante reducción de los anticuerpos de partida, seguida por recombinación oxidativa de la cadena, tal como se ha empleado hasta la fecha en la preparación de anticuerpos monovalentes (ver, por ejemplo, Glennie *et al*., Nature 295:712 (1982)).

Además de la monovalencia por la IgE, en otras realizaciones se modifican los anticuerpos de forma que contengan una proporción máxima de secuencia humana (medida con retención de la actividad requerida o deseada), es decir, son convertidos en quimeras o son humanizados. En ambos casos, el efecto funcional es colocar la capacidad unidora anti-IgE del anticuerpo de ratón u otro anticuerpo donante en un entorno humano para hacerlo tan no inmunogénico como sea posible. Los procedimientos generales para preparar quimeras y anticuerpos humanizados son bien conocidos (tal como se ha destacado más arriba). Se sustituye una cantidad mínima de secuencia de anticuerpo que no es humano en el anticuerpo humano receptor. Típicamente, los residuos que no son humanos se sustituyen en V_H, V_L, la interfaz V_H-V_L, o la estructura del anticuerpo humano receptor. Generalmente, los CDR de Kabat de los anticuerpos humanizados son aproximadamente un 80%, y más típicamente aproximadamente un 90% homólogos con los CDR donantes que no son humanos. Por otra parte, los residuos de la interfaz V_H-V_L y de la estructura del anticuerpo humano son aproximadamente un 80%, ordinariamente un 90%, y preferiblemente aproximadamente un 95%, homólogos con el anticuerpo receptor. La homología se determina mediante el alineamiento máximo de los residuos idénticos. El anticuerpo resultante es (a) menos inmunogénico en humanos que el anticuerpo de ratón, y (b) es capaz de unirse a huIgE unida a FCEL, pero es sustancialmente incapaz de unirse a huIgE unida a FCEH. Tales anticuerpos típicamente comprenden un anticuerpo humano que está sustituido por un residuo aminoácido procedente de una región determinante de la complementariedad (CDR), la interfaz V_L-V_H, o una región estructural de un anticuerpo anti-IgE que no es humano, el cual es capaz de unir. Uno o más, y preferiblemente todos, de los CDR L1, L2, L3, H1, H2 o H3 que no son humanos son sustituidos en el anticuerpo humano receptor.

Para un uso terapéutico se prefirieron las características poseídas por el anticuerpo MAE11. Puesto que el MAE11 se unión a IgE soluble, se unión a células B portadoras de IgE, bloqueó la unión de la IgE al receptor de baja y alta afinidad de la IgE, inhibió *in vitro* la producción de IgE, y no consiguió unirse a basófilos recubiertos de IgE, se escogió como el anticuerpo donante para su humanización. El anticuerpo receptor fue la cadena kappa (ligera) humana del subgrupo I y la cadena pesada del subgrupo III de Kabat, aunque se comprenderá que puede emplearse convenientemente cualquier otro anticuerpo humano. De forma sorprendente, los resultados óptimos no se obtuvieron mediante sustituyendo simplemente los CDR de ratón en lugar de los CDR en un anticuerpo humano receptor (Figura 3; Tabla 4, ver más abajo). En cambio, fue necesario restablecer los residuos hidrofóbicos estructurales del donante, tales como los 78, 48, 49, 63, 67; 82 u 82c de V_H, o los 13, 19, 58, 78 ó 104 de la V_L, con objeto de conseguir un grado de inhibición de la unión de la IgE similar al del anticuerpo donante. Mientras que estos residuos funcionan para establecer la conformación de los CDR, ellos no están generalmente expuestos al exterior del anticuerpo, de forma que el uso de residuos de ratón no debiera causar un impacto significativamente sobre la inmunogenicidad. Otros residuos que no son de CDR que ejercen un efecto sobre la unión incluyeron los V_H 60, 61, 37, 24, y los V_H 50, 52, 58 y 95 (que no son del CDR según Clothia), y los V_L 4, V_L 33 (que no son del CDR según Clothia) y el V_L 53 (que no es del CDR según Clothia). Los residuos hidrofóbicos estructurales humanos generalmente son sustituidos por otros residuos hidrofóbicos (especialmente aquéllos procedentes del anticuerpo donante) tales como la valina, isoleucina, leucina, fenilalanina o metionina. Los residuos restantes que no son del CDR son sustituidos con cualquier otro residuo aminoácido, pero, una vez más, preferiblemente por el residuo de ratón que se halla en el sitio análogo.

En general, el carácter del anticuerpo anti-IgE se mejora sustituyendo, suprimiendo o insertando un residuo en, o adyacente a, los sitios de la V_L 30, 30b, 30d, 33, 55, 57, 58, 78, 93 ó 104 (los residuos 30, 30a, 30b, 30c, 30d se identifican con referencia a la secuencia DYDGD en la secuencia de cadena ligera ilustrada en la Figura 3) y/o los residuos de la V_H 24, 37, 48, 49, 54, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 69, 78, 82, 82c, 97, 100a ó 100c.

La posición V_H-78 se sustituye más preferiblemente con fenilalanina. No obstante, también se sustituye con leucina, valina, isoleucina, metionina, alanina o cualquier otro residuo que resulte en una mejora de las características del anticuerpo (ver más abajo).

La posición V_H-60 se sustituye más preferiblemente con asparagina, aunque la sustitución con glutamina, histidina, lisina, arginina o cualquier otro residuo que mejore las características del anticuerpo cae dentro del ámbito de esta invención.

La posición V_H-61 se sustituye más preferiblemente con prolina, aunque la sustitución con glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina o cualquier otro residuo que resulte en una mejora de las características del anticuerpo también es apropiado.

Los residuos del CDR se importaron a partir del MAE11 donante. Estos incluyeron cuatro insertos en V_{L1} 30a-30d, así como 91-94 (V_{L3}), V_{H1} 27-29, 29a, 33 y 34, V_{H2} 53-55 y V_{H3} 97-101. V_L 30, 30b o 30d, así como V_H 97, 100a o 100c, son importantes para conferir al CDR la capacidad de unir la IgE.

La posiciones 97, 100a y 100c de la V_H en humae11 (MAE11 humanizado) son todas ellas histidinas, y 2 son arginina en MAE15. Estos residuos son importantes en la unión de la IgE. Uno, dos o tres de estos se modifican mediante sustitución con residuos básicos, particularmente lisina o arginina, pero también con alanina, glicina, valina, isoleucina, serina, treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, o prolina.

Las posiciones 30, 30b y 30 de la V_L del humae11 son también importantes para unir la IgE. En el humae11 cada una de estas posiciones está ocupada por el residuo ácido, ácido aspártico. Ellas son sustituidas en otras realizaciones por ácido glutámico, pero podrían sustituirse también por alanina, glicina, valina, isoleucina, serina, treonina, asparagina, glutamina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano o prolina. Se encuentra dentro del ámbito de esta invención invertir las cargas de las posiciones V_L 30, 30b y 30d con aquéllas de las V_H 97, 100a y 100c, por ejemplo, empleando residuos de ácido aspártico en los tres sitios V_H (2 en el caso del MAE15 humanizado) e histidina en los tres sitios V_L.

Los residuos también podrían insertarse adyacentes a las posiciones V_H 97, 100, 100c, 61 o 61, o los residuos de V_L en las posiciones 30, 30b, 30d o 78. Los residuos insertados generalmente serán del mismo tipo, por ejemplo, se insertaría un residuo ácido adyacente a V_L-30, 30b o 30d, mientras que un residuo básico se inserta adyacente a V_H-97, 100 ó 100c. También podrían suprimirse los residuos en los tres sitios.

Los anticuerpos monovalentes para la IgE humanizados también se incluyen dentro del ámbito de esta invención. En este caso, la humanización se extiende al brazo anti-IgE así como, si es necesario, al (a los) brazo(s) restante(s). Por supuesto, los brazos que no son unidores de la IgE pueden originarse a partir de anticuerpos humanos y en tal caso no requerirán humanización.

Las variaciones anteriores se construyen introduciendo mutaciones en el ADN que codifica la forma precursora del anticuerpo, y expresando el ADN en cultivos de células recombinantes o similares. Esto se consigue mediante procedimientos convencionales de mutagénesis dirigida contra un sitio. A continuación se examinan las variantes en busca del carácter deseado en ensayos convencionales *per se*. En el caso de anti-huIgE, el carácter deseado incluye incrementar la afinidad del anticuerpo por la huIgE, incrementar su capacidad y especificidad por la IgE unida a FCEL, incrementar la concentración de anticuerpo requerida para estimular la liberación de histamina a partir de mastocitos o basófilos, reducir la inmunogenicidad en humanos, y otras mejoras evidentes al técnico común. La optimización de estos caracteres frecuentemente requerirá equilibrar una mejora respecto otra, y, por tanto, es un asunto a juzgar y depende de los parámetros de prestaciones dictados por el uso pretendido del anticuerpo.

Es preferible usar una IgG1 humana (u otro anticuerpo fijador de complemento) como la inmunoglobulina receptora para la humanización, aunque también pueden usarse como receptoras las hu IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM, IgD o IgA. Preferiblemente el receptor es un anticuerpo IgG que fija el complemento o un anticuerpo IgG capaz de participar en la ADCC.

Usos terapéuticos, diagnósticos y preparatorios

Los anticuerpos en la presente invención son útiles para identificar variantes de la secuencia de aminoácidos de la IgE en las que los dominios unidores de FCEL o FCEH han sido modificados. Los polipéptidos candidatos específicos para el FCEL o FCEH se incuban con estos anticuerpos, y análogos a los que estos anticuerpos no consiguen unirse se seleccionan para su ulterior evaluación, por ejemplo, determinación, respectivamente, de sus características de unión al receptor FCEH y FCEL. Cualquier anticuerpo, tanto si es de ratón, humano, o originario de otra especie animal, o una variante de los mismos como las inmunoglobulinas humanizadas descritas más arriba, que tenga la especificidad epitópica de cualquiera de los anticuerpos MAE10-MAE17 (especialmente MAE11/15, MAE13 o MAE17) será igualmente aceptable. Tales anticuerpos se identifican fácilmente inmunizando un animal apropiado o usando un sistema de selección de Fv *in vitro*, por ejemplo, un fagémido, con la IgE con origen animal apropiado, y examinando los animales o productos en busca de anticuerpos que tengan la capacidad de competir por la IgE con el MAE11/15, 13, 17, u otros anticuerpos que contengan sustancialmente el(los) mismo(s) sitio(s) epitópico(s) que aquéllos descritos en la presente invención. Tal como se ha destacado, los anticuerpos son deseablemente monovalentes para la IgE unida a FCEL cuando se emplean terapéuticamente. Ellos podrían se bivalentes y/o biespecíficos cuando se usan para purifica IgE a partir de plasma, suero, o cultivos celulares recombinantes.

Los anticuerpos anti-IgE (especialmente aquéllos con inmunogenicidad reducida) son útiles en terapias para el tratamiento o profilaxis de las alergias.

Los anticuerpos típicamente se administran a pacientes que se sabe están sensibilizados a un alérgeno, preferiblemente antes de una respuesta alérgica aguda. Las dosis y la vía de administración dependerán de los funcionalidades accesorias que acompañen al anticuerpo (por ejemplo, agentes citotóxicos, funciones efectoras de inmunoglobulinas, etc.), la condición del paciente (incluyendo la población de células B o mastocitos y basófilos), la vida media del anticuerpo, la afinidad del anticuerpo por su receptor, y otros parámetros conocidos por el clínico. Como guía general, se determinará a partir de ensayos sanguíneos la cantidad de células diana circulando en el paciente, y se determinará la cantidad de anticuerpo para desplazar o competir efectivamente con la IgE endógena, tomando en consideración la población de receptores FCEH así como la vida media y afinidad del anticuerpo por la IgE.

Los polipéptidos terapéuticos se administran mediante vía intravenosa, intrapulmonar, intraperitoneal, subcutánea y otras vías apropiadas. Preferiblemente, los polipéptidos se administran s.c. o i.v. a lo largo de un período de aproximadamente 1 a 14 días, según se precise. En el caso de suprimir la síntesis de IgE, se determinará la cantidad de anticuerpo anti-IgE necesario para inhibir, suprimir o destruir una porción sustancial de la población de células B que secretan IgE. La inhibición o supresión de la población de células B incluye una de, o ambas de las reducciones en la secreción de IgE y la atenuación del número total de células B que secretan IgE. Las dosis candidatas se determinan fácilmente mediante el uso de cultivos de células *in vitro* o animales modelo.

La terapia de los desórdenes alérgicos con anti-IgE unida a FCEL opcionalmente se consigue con otras terapias conocidas para alergias. Estas incluyen la administración de interferón gamma, la desensibilización al alérgeno, la reducción en la exposición al alérgeno, el tratamiento con antihistamínicos, y similares.

Ejemplo 1

Preparación de anticuerpos monoclonales contra la IgE

Se usaron ocho anticuerpos monoclonales con la capacidad de bloquear la unión de la IgE al FCEH. Estos anticuerpos monoclonales, denominados como MAE10-MAE17, se prepararon de la siguiente manera. Se preparó IgE humana purificada a partir de sobrenadantes de células U266B1 (ATCC TIB 196) usando cromatografía de afinidad sobre un anticuerpo anti-IgE previamente aislado (Genentech MAE1, aunque otros anticuerpos anti-IgE son igualmente útiles). Para MAE12, se inmunizaron cinco ratones hembras BALB/c, de seis semanas de edad, en su plantas de los pies con 10 μg de IgE purificada en adyuvante de Ribi. La inyecciones subsiguientes se realizaron de la misma forma una y tres semanas después de las inmunizaciones iniciales. Tres días después de la inyección final, se retiraron los nodos linfáticos inguinal y popliteal y se juntaron, y se preparó una única suspensión de células pasando el tejido a través de una tela metálica de acero. Para MAE14, MAE15 y MAE13, las inmunizaciones se realizaron de una forma similar, excepto que para el MAE13 se usaron 30 μg de IgE por inyección, y que se usó la IgE 315-547 como un estimulante de pre-fusión; para MAE14 y MAE15 se usaron cinco inyecciones de 50 μg cada una; y el inmunogén de IgE para MAE17 fue la IgE 315-547. Para MAE10 y MAE11, la inyecciones se administraron subcutáneamente en dos dosis de 100 μg y un estímulo final de 50 μg, y se usaron células del bazo para las fusiones. Las células se fusionaron en una proporción de 4:1 con mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC CRK 1580) en medio DMEM con glucosa elevada conteniendo 50% p/v de polietilenglicol 4000.

Las células fusionadas se sembraron a una densidad de 2×10^5 por pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos. Transcurridas 24 horas se añadió medio selectivo HAT (hipoxantina/aminopteridina/timidina, Sigma Chemical Company, #H0262). De 1440 pocillos sembrados, 365 contenían células creciendo después de la selección con HAT.

Quince días después de la fusión, se ensayaron los sobrenadantes, en busca de la presencia de anticuerpos específicos para la IgE humana, usando un ensayo de inmunosorción unido a enzima (ELISA). El ELISA se realizó como sigue, realizándose todas las incubaciones a temperatura ambiente. Las placas de ensayo (Nunc Immunoplate) se recubrieron durante 2 horas con IgG anti-ratón de rata (Boehringer Mannheim, #600-500) a 1 μg/ml en tampón carbonato sódico 50 mM, *p*H 9,6; a continuación se bloquearon con albúmina de suero bovino al 0,5% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 30 minutos; entonces se lavaron cuatro veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST). Se añadieron los sobrenadantes de ensayo y se incubaron dos horas con agitación, a continuación se lavaron cuatro veces con PBST. La IgE humana (purificada a partir de células U266, tal como se ha descrito más arriba) se añadió a 0,5 μg/ml, y se incubó durante una hora con agitación, a continuación se lavó cuatro veces con PBTS. Se añadió anticuerpo de cabra anti-IgE conjugado con peroxidasa de rábano silvestre (Kirkegaard & Perry Labs, #14-10-04, 0,5 mg/ml) a una dilución 1:2500, y se incubó durante una hora, a continuación se lavó cuatro veces con PBTS. Se revelaron las placas mediante la adición de 100 μl/pocillo de una solución que contenía 10 mg de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (Sigma Chemical Company, #P8287) y 10 μl de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% en 25 ml de tampón de citrato-fosfato, *p*H 5,0, e incubando durante 15 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo 100 μl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. Los datos se obtuvieron leyendo las placas en un lector automático de placas de ELISA a una absorbancia de 490 nm. Para MAE12, se ensayaron 365 sobrenadantes y 100 fueron específicos para la IgE humana. Se obtuvieron frecuencias de especificidad similares cuando se examinaron los otros anticuerpos. Todos los anticuerpos monoclonales descritos en la presente invención fueron del isotipo IgG1, excepto el MAE17, el cual era una IgG2, y MAE14, el cual era una IgG2a.

Cada uno de los anticuerpos específicos para la IgE fue ensayado además en ensayos basados en células y en ensayos en placa para seleccionar anticuerpos que unieran la IgE de tal forma que inhibieran la unión de la IgE al FCEH, y que no fueran capaces de unir la IgE unida a FCEH. Los resultados de estos ensayos se detallan más abajo en la Tabla 1a y Tabla 1b.

TABLA 1a

Resumen de las características de los mAb de ratón anti-HuIgE

mAb	Inmu-nogén	Plan /dosis (µg)	Fuente de células B	Isotipo	% de unión de FCEH unido a IgE	Liberación[2] de histamina por PLB (EC50)	Cantidad que bloquea el FCEH[3] (EC50)
MAE 1	PS IgE	3×50	Nodo linfático	IgG1	,05 µg/ml	1 µg/ml	0,3 µg
MAE 10	U266 IgE	2×100, 1×50	Bazo	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	2,5 µg
MAE 11	U266 IgE	2×100, 1×50	Bazo	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	0,6 µg
MAE 12	U266 IgE	3×30	Nodo linfático	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	0,8 µg
MAE 13	U266 IgE	3×30	Nodo linfático	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	0,6 µg
MAE 14	U266 IgE	5×50	Nodo linfático	IgG2a	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	2,5µg
MAE 15	U266 IgE	5×50	Nodo linfático	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	0,6 µg
MAE 16	RHIgE aa 315-547	5×1	Nodo linfático	IgG1	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	0,7 µg
MAE 17	RHIgE aa 315-547	5×1	Nodo linfático	IgG2b	sin unión a 10 µg/ml	>100 µg/ml	>5,0 µg

TABLA 1b

Resumen de las características de los mAb de ratón anti-HuIgE (Continuación)

mAb	% de unión a membrana. IgE sobre U266BL (EC50[4])	% de unión de IgE sobre FcERII (CD23) (EC50[5])	Bloques de 1 µg de IgE que se unen al FcERII (EC50)[6]	Inhibición *in vitro* de la síntesis de IgE[7]	Constante de afinidad por la IgE[8] (Kd)
MAE 1	0,4 µg/ml	0,05 µg/ml	>100 µg	(-)	$5,4\times10^{-8}$
MAE 10	0,5 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	2,5 µg	(-)	7×10^{-9}
MAE 11	0,15 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	0,6 µg	(+)	3×10^{-8}
MAE 12	>10 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	5,0 µg	(-)	4×10^{-7}
MAE 13	1 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	0,7 µg	(++)	5×10^{-8}
MAE 14	6 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	2,5 µg	(±)	$1,4\times10^{-8}$
MAE 15	6 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	0,6 µg	(±)	7×10^{-8}
MAE 16	10 µg/ml	0,05 µg/ml	5 µg	(+)	N.D.
MAE 17	10 µg/ml	sin unión a 10 µg/ml	5 µg	(++)	N.D.

1. *Ensayos basados en FACS para el análisis de monoclonales anti-IgE humana*. Examen de la unión de monoclonales de ratón anti-IgE humana a IgE sobre CHO 3D10 (FcERI alpha +).

a. Se incubaron células CHO 3D10 (transfectante estable de la cadena alfa del FcERI; Hakimi *et al*., J. Biol. Chem. 265:22079), a 5×10^5 células por muestra, con IgE de U266 estándar (lote nº 13068-46) a 10 μg/ml en 100 μl de tampón FACS (0,1% BSA, azida sódica 10 mN, en PBS, *p*H 7,4), durante 30 minutos a 4ºC, seguida por un lavado con tampón FACS. La cantidad de unión de IgE se determina incubando una alícuota de células cargadas con IgE con una IgG policlonal anti-humana de conejo conjugada con FITC (Accurate Chem. Co. AXL-475F, lote nº 16), a 50 μg/ml, durante 30 minutos a 4ºC, seguida por tres lavados con tampón FACS.

b. Se incubaron células cargadas con IgE con 100 μl de sobrenadante de hibridoma de IgE anti-humana de ratón (concentración de IgG de ratón oscilando desde 1 hasta 20 μg/ml), durante 30 minutos a 4ºC, seguida por un lavado con tampón FACS. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-IgE humana (MAE1) a 10 μg/ml como control positivo de la unión. El anticuerpos monoclonal de Genentech (MAD 6P) que no reconoce la IgE se usó a 10 μg/ml como control negativo.

c. La unión del monoclonal a la IgE humana sobre células CHO se detectó incubando las células con 20 μg/ml de F(ab)2 de cabra anti-IgG de ratón purificado por afinidad (Organon Teknica, nº de catálogo 10711-0081), durante 30 minutos a 4ºC, seguido por tres lavados con tampón FACS. Se añaden las células a 400 μl de tampón conteniendo 2 μg/ml de yoduro de propidio (Simga, nº de catálogo P4170) para teñir células muertas.

d. Se analizaron las células en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCAN. Las puertas para la dispersión hacia adelante de la luz y la dispersión a 90 grados se ajustan para analizar una población de células homogénea. Las células muertas, que se tiñen con yoduro de propidio se excluyeron de los análisis. Los sobrenadantes de hibridomas que no unían la IgE sobre células CHO 3D10 se consideraron candidatos para su ulterior examen.

2. *Liberación de histamina a partir de basófilos de sangre periférica:*

La sangre heparinizada se obtuvo a partir de donantes normales y se diluyó 1:4 en un tampón Tyrodes modificado (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ y $MgCl_2$ 10 mM, 0,3 mg/ml de HSA, *p*H 7,35), se incubaron a continuación con IgE humana 1 nM (ND) a 4ºC durante 60 minutos. A continuación se añadieron las células al tampón Tyrodes que contenía o el Ab monoclonal anti-IgE de ratón (10 mg/ml) o un antisuero policlonal anti-humano como control positivo, y se incubaron a 37ºC durante 30 minutos. Se precipitaron las células, se acetiló la histamina en el sobrenadante, y se determinó el contenido en histamina usando un equipo RIA (AMAC, Inc., Wesbrook, Main). La histamina total se determinó a partir de células sometidas a varias rondas de congelación y descongelación. El porcentaje de liberación de histamina se calculó como contenido nM de histamina en el sobrenadante - nM histamina liberada espontáneamente, dividido por la histamina nM total en la muestra.

3. *Bloqueo de IgE conjugada con Fitc que se une a la cadena alfa del FcERI.*

El efecto de los anticuerpos sobre la unión a la IgE se estudió preincubando IgE marcada con FITC con los diversos anticuerpos MAE, a 37ºC durante 30 minutos, en PBS que contenía el 0,1% de BSA y azida sódica 10 mM, *p*H 7,4; incubando a continuación el complejo con 5×10^5 células 3D10 a 4ºC durante 30 minutos. A continuación se lavaron las células tres veces y se midió la fluorescencia promedio del canal a 475 nM. Como control se usó un anticuerpo anti-IgE humana de ratón (MAE1) que no bloquea la unión de la IgE a la cadena alfa del FcERI.

4. *Análisis de la unión de [...] de ratón anti-IgE humana a la membrana de células B U266 positivas para la IgE.*

a. Se cultivan células B U266 (+ para IgE en membrana) en medio base suplementado con 15% de suero fetal bovino desactivado mediante calor (Hyclone nº de catálogo A-1111-L), penicilina, estreptomicina (100 unidades/ml) y L-glutamina (2 mM).

b. Se incuban las células (5×10^5/alícuota) en 100 μl de tampón FACS conteniendo monoclonales de ratón anti-IgE humana a 10, 55, 1, 0,5 y 0,1 μg/ml, durante 30 minutos sobre hielo, en placas de microvaloración de 96 pocillos de fondo redondeado, seguido por dos lavados con tampón FACS. El monoclonal MAE1 de Genentech se usó como control positivo.

c. Se incubaron las células en 100 μl de tampón FACS que contenía 50 μg/ml (1:20 de reserva) de IgG F(ab')2 anti-ratón de cabra, purificada por afinidad, conjugada con FITC (Organon Teknica, nº de catálogo 1711-0084), durante 30 minutos sobre hielo, seguida por tres lavados con tampón FACS. Las células se añadieron a 400 μl de tampón FACS conteniendo yoduro de propidio a 2 μg/ml para teñir las células muertas.

5. *Ensayos de unión, basados en FACS, a células B IM9 FcERII(CD23+).*

a. Análisis FACS de la unión de la IgE a la línea celular B IM0 FcERII(CD23)(+). Las células B IM9 de mieloma (ATCC CCL 159 (*Ann. N.Y. Acad. Sci*. 190:221-234 (1972)) se mantuvieron en medio base GIF con un 10% de suero fetal bovino, desactivado mediante calor, penicilina, estreptomicina (100 unidades/ml), y L-glutamina (2 mM).

b. Las células (5×10^5) se incubaron en 100 μl de tampón FACS que contenía IgE U266 estándar a 2 μg/ml, durante 30 minutos a 4ºC, en placas de microvaloración de 96 pocillos, seguida por dos lavados con tampón FACS. Como control, las células se cultivaron en tampón solo o tampón que contenía 2 μg/ml de Ig1 humana (Behring Diagnostics, nº de catálogo 400112, lote nº 801024).

c. A continuación se incubaron las células con monoclonales de ratón anti-IgE humana, a 0,1 hasta 10 μg/ml, durante 30 minutos sobre hielo. El monoclonal MAE1 de Genentech se usó como control positivo.

d. Se incubaron las células en 100 μl de tampón FACS que contenía IgG F(ab')2 anti-ratón de cabra a 50 μg/ml (Organon Teknica, nº de catálogo 1711-0084), durante 30 minutos a 4ºC, seguida por tres lavados con tampón FACS.

e. Las células se añadieron a 400 μl de tampón FACS conteniendo yoduro de propidio a 2 μg/ml para teñir las células muertas.

f. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCAN de Becton Dickinson. Las puertas para la dispersión hacia adelante de la luz y la dispersión a 90 grados se ajustan para analizar una población de células homogénea, y las células muertas, que se tiñen con yoduro de propidio, se excluyeron de los análisis. Las células positivas para el FITC (unidoras de la IgE) se analizaron en relaciona a las células teñidas con FITC-anticuerpo de conejo anti-IgE humana solo.

g. Como control positivo para determinar el nivel de CD23 sobre la superficie de las células IM9 en cada experimento, se tiñó una alícuota de células con el monoclonal Leu 20 de ratón (anti-CD23) de Becton Dickinson a 10 μg/ml, durante 30 minutos a 4ºC, seguida por 2 lavados. A continuación se incubaron las células con f(ab')2 de cabra anti-IgG de ratón, purificados por afinidad, conjugados con FITC.

6. *Bloqueo con anticuerpos de la unión de IgE conjugada con FITC al receptor de baja afinidad de la IgE.*

La unión de IgE 40 nM marcada con FITC al receptor de baja afinidad de la IgE (CD23) expresado sobre células linfoblastos B IM-9 se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSCAN. El efecto de los anticuerpos sobre la unión de la FITC-IgE se estudió preincubando FITC-IgE de ratón con anticuerpos quimera anti-humanos a 0,1 hasta 10 μg/ml, a 37ºC durante 30 minutos, en PBS que contenía 0,1% de BSA y azida sódica 10 mM, *p*H 7,4, incubando a continuación el complejo con 5×10^5 células a 4ºC durante 30 minutos. Las células se lavaron entonces tres veces y se midió la fluorescencia promedio del canal a 475 nm.

7. *Protocolo de ensayo in vitro de la IgE.*

a. Se separaron células mononucleares de la sangre de donantes normales.

b. Se lavaron extensivamente las células con solución salina tamponada con fosfato para suprimir tantas plaquetas como fuera posible.

c. Las células mononucleares se contaron y resuspendieron en medio a 1×10^6 células/ml (Medio=DMEM + pen/strep + 15% suero de caballo + IL-2 (25 U/ml) + IL-4 (20 ng/ml)).

d. Se añadieron anticuerpos a las concentraciones apropiados en los días 0, 5 y 8.

e. Los cultivos se incubaron en placas de cultivo Falcon de 24 pocillos durante 14 días.

f. El día 14 se recogieron los sobrenadantes y se ensayó su concentración de IgE mediante un protocolo ELISA específico para la IgE.

8. *La constante de afinidad (kd) de los mAb de ratón por la IgE humana se determinó mediante unión en equilibrio (análisis de Scatchard) como sigue*:

a. Los alotipos ND y PS de la IgE se yodaron mediante el procedimiento de la cloramina T, y se separaron del ^{125}I Na libre con una columna Sephadex G25 PD10 (Pharmacia, nº de catálogo 17-0851-01) en tampón RIA:PBA, 0,5% de albúmina de suero bovino (Sigma, nº de catálogo A-7888), 0,05% de Tween-20 (Sigma, nº de catálogo P-1379), 0,01% de Thimerosal (Sigma, nº de catálogo T-5125), *p*H 7,4. Se precipitaron aproximadamente el 78-95% de las cuentas posteriores a la columna con ácido tricloroacético al 50% y la actividad específica de las preparaciones de IgE yodada oscilaron entre 1,6 y 13 μCi/μg, asumiendo una eficiencia de recuento del 70%.

b. Se añadió una concentración fija de ^{125}I IgE (aproximadamente 5×10^4 c.p.m.) a diferentes concentraciones de IgE sin marcar (1 a 200 mM) en un volumen final de 0,1 ml de tampón RIA, en tubos de polipropileno de 12×75 mm. Entonces se añadieron los mAB anti-IgE humana (concentración final: 20 nM) en 0,1 ml de tampón RIA para un volumen de ensayo final de 0,2 ml.

c. Las muestras se incubaron durante 16-18 horas a 25ºC con agitación continua.

d. La ^{125}I IgE unida y libre se separaron mediante la adición de 0,3 ml de una mezcla de IgG anti-ratón de cabra purificada por afinidad (Boehringer Mannheim, nº de catálogo 605 208) acoplada Sepharose 4B activada con CNBr (nº de catálogo 17-0430-01) y Sepharose Proteína A portadora (Repligen, nº de catálogo IPA 300), en tampón RIA, y se incubaron de 1 a 2 horas a 25ºC con agitación continua. Entonces se añadió tampón RIA (1 ml), y se centrifugaron los tubos 5 minutos a 400 ×g. Las muestras se contaron para determinar las cuentas totales. Los sobrenadantes se aspiraron con una pipeta Pasteur delicadamente estirada, las muestras se contaron de nuevo, y se calcularon las cuentas unidas respecto las cuentas libres.

e. El análisis de Scatchard se realizó usando un programa en Fortran (scanplot) basado en el programa Ligand escrito por P. Munson en el NIH. Scatplot usa un ajuste unido de acción de masas como una función del total usando el análisis de regresión del tipo Rodbard.

Ejemplo 2

Preparación de variantes de la IgE

En base al modelo de Fc IgE de Padlan y Davies (*Mol. Immunol*. 23:1063 (1986)), el cual se basa en la estructura cristalina del Fc IgG1 humano (Deisenhofer, *Biochem* 20:2361-2370 (1981)), se diseñaron una serie de mutantes que podían usarse para ensayar la unión de la IgE humana a sus receptores. Estos mutantes se denominaron Emut 1-13, y se listan en la Tabla 2 siguiente. El dominio Fcϵ3 está formado por siete hebras-β, las cuales forman una estructura de hoja-β representativa de todos los dominios de inmunoglobulinas; hay seis bucles que conectan estas siete hebras-β. Nos referimos a estos bucles por las hebras-β que los conectan, por ejemplo, el bucle AB conecta las hebras-β A y B. Hemos construido mutantes de la IgE humana en los que hemos sustituido cinco de los bucles del dominio Fcϵ3 por sus contrapartidas procedentes de la IgG1 humana (Tabla 2, 1-5). El sexto bucle contiene el sitio de glicosilación

tanto en IgE como en IgG y, por tanto, no se alteró. Un mutante (Tabla 2, 6) se construyó intercambiando la hebra-β D del Fcϵ3 humano por su contrapartida Fcgamma2 de la IgG1 humana. Siete mutantes adicionales (Tabla 2, 7-13) consistieron en la sustitución de residuos Ala en las hebras-β del Fcϵ3 y de un bucle en el Fcϵ2.

Se clonó un gen de la IgE humana procedente de U266, una línea celular disponible públicamente. El gen se clonó en un vector fagémido previamente descrito que contenía el potenciador y promotor del citomegalovirus humano, un intrón 5', y la señal de poliadenilación del sv40 (Gorman *et al*., *DNA and Prot. Eng. Techn.* 2:3-10 (1990)). La mutagénesis se realizó mediante el procedimiento de Kunkel (T. A. Kunkel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985)) usando tampones y enzimas proporcionados con el equipo de mutagénesis *in vitro* de fagémido Mutagene de BioRad, junto con los oligonucleótidos que codificaban las secuencias de la IgG1 humana mostradas en la Tabla 2 siguiente. Las secuencias de los ADN de IgE mutante se comprobaron sólo en el sitio de mutación usando la secuenciación con ^{35}S dideoxi.

TABLA 2

Mutante	Nº de residuo según Kabat (estructura)[1]	Secuencia del Fcε3 de la IgE humana	Secuencia del Fcγ2 de la IgG1 humana
1	377-385 (1AB)	FDLPIRKS (SEC. Nº ID. 10)	KDTLMISRT (SEC. Nº ID. 11)
2	396-401 (1BC)	APSKGT (SEC. Nº ID. 12)	SHEDPQ (SEC. Nº ID. 13)
3	407-420 (1CD)	SRASGKPVNHS (SEC. Nº ID. 14)	YVDGVQVHNAK (SEC. Nº ID. 15)
4	444-453 (IEF)	GTRDWIEGET (SEC. Nº ID. 16)	LHQDWLDGKE (SEC. Nº ID. 17)
5	465-469 (IFG)	RALM (SEC. Nº ID. 18)	APIE (SEC. Nº ID. 19)
6	423-428 (βD)	KEEKQR (SEC. Nº ID. 20)	PREQQY (SEC. Nº ID. 21)
7	383-385 (IAB)	RKS	[AAA][2]
8	387, 389 (βD)	T(I)T	[A(I)A][2]
9	403, 405 (βC)	N(L)T	[A(L)A][2]
10	438-440 (βC)	T(S)T	[A(S)A][2]
11	455, 457, 459 (βF)	Q(C)R(V)T (SEC. Nº ID. 22)	[A(C)A(V)A][2] (SEC. Nº ID. 23)
12	471, 473 (βG)	S(T)T	[A(T)A][2]
13	329-331, 334-336	QKH(WL)SDR (SEC. Nº ID. 24)	[AAA(WL)AAA][2] (SEC. Nº ID. 25)

[1] bucle = 1, hebra-B = β

[2] Las secuencias entre paréntesis proceden de mutantes en los que se usaron residuos alanina en vez de secuencias de la IgG para remplazar la secuencia diana en la IgE. Los residuos entre paréntesis no se alteraron en estos mutantes.

Las IgE mutantes se expresaron transitoriamente en células 293 de riñón embrionario humano (Gorman *et al*., ver más arriba), se purificaron sobre una columna de afinidad de anticuerpo de ratón anti-IgE humana, y se analizaron las muestras usando SDS-PAGE para verificar que las proteínas mutantes tenían el peso molecular apropiado.

Ejemplo 3

Ensayo de unión de la IgE soluble

Este ensayo se un ELISA de inhibición secuencial que mide sólo la unión al FCEH. En este ensayo, se recubren placas de ELISA con un anticuerpo monoclonal contra el FCEH, a una concentración de 1 μg/ml en carbonato sódico 50 mM, *p*H 9,6, durante dos horas a temperatura ambiente, y se bloquean durante dos horas con PBS conteniendo un 0,5% de albúmina de suero bovino (PBSA), a continuación se lavan tres veces con tampón de lavado de ELISA (0,05% Tween 20 en PBS). Se añade FCEH soluble producido de forma recombinante a una concentración de 50 unidades/ml y se incuba durante una hora, entonces se lava cinco veces con tampón de lavado de ELISA. A continuación se añaden las muestras de IgE mutante a los pocillos a 50 ng/ml durante 15 minutos, seguidas por cinco lavados con tampón de lavado de ELISA. Se añade estreptoavidina conjugada con peroxidasa de rábano silvestre (Sigma Chemical Company, #S5512) a una dilución 1:5000 durante 15 minutos, a continuación se lava tres veces con tampón de lavado de ELISA. El color se reveló con un sistema de sustrato de peroxidasa de tetrametilbencidina (Kirkegaard & Perry Labs, #50-76-00, nº de lote NA 18) durante siete minutos a 25ºC. Se detuvo la reacción mediante la adición de HCl 1 M. La capacidad del mutante de la IgE para unirse al FCEH se evalúa por el grado con el que se impide la unión de la IgE biotinilada. Este ensayo está diseñado para ensayar cualquier tipo de unión al FCEH por parte de la IgE mutante, y no se pretende que determine la afinidad del mutante por el FCEH respecto la IgE nativa.

Ensayos basados en FACS para mutantes de la IgE de U266

Los sobrenadantes de cultivos de tejidos de células 293 transfectadas con el cADN de la IgE de U266 se recolectaron a la 48 o a las 96 horas posteriores a la transfección. Los sobrenadantes del cultivo de tejidos se concentraron 5 veces con concentradores centrífugos Amicon Centriprep 30® (PM de corte de 30.000). Los sobrenadantes concentrados se pasaron a través de una columna de afinidad de monoclonal de ratón anti-IgE de U266 (Genentech MAE1 acoplado a CNBr-Sepharose). La IgE de U266 se eluyó de la columna con cianato potásico 3,0 M en tampón Tris 50 mM, *p*H 7,8. Las fracciones eluidas que contenían proteína, según se determinó mediante OD a 280 nm, se juntaron y colocaron en concentradores Amicon Centricon 30®. El tampón de elución se cambio por PBS haciendo pasar varios volúmenes de PBS a través del concentrador. El volumen final de sobrenadante purificado mediante afinidad osciló entre 0,5-1 ml. La integridad estructural de los mutantes de IgE recombinantes se analizó sobre geles de SDS-PAGE al 1-12%, y se comparó con IgE de U266 estándar obtenida a partir de la línea celular U266. Los mutantes también se analizaron por su capacidad para unirse a una serie de anticuerpos monoclonales y anticuerpos para IgE para verificar aún más el correcto plegamiento e identidad estructural con la IgE nativa. La concentración de IgE inmunoreactiva para cada mutante de la IgE se determinó tal como sigue mediante un ELISA de captura de IgE humana. Se recubrieron placas Immunoplate Maxisorp® de Nunc (Nunc, #4-39451) a lo largo de la noche a 4ºC con una IgG1 de ratón anti-IgE de U266 de Genentech (MAE1) a 1 μg/ml en tampón de recubrimiento (tampón carbonato sódico 50 mM, *p*H 9,6). El anticuerpo de recubrimiento se suprimió mediante tres lavados con tampón de lavado de ELISA (0,05% Tween-20 (US Biochemical Corporation, #20605) en PBS). Los sitios no específicos fueron bloqueados con tampón diluyente de ELISA (solución salina tamponada con Tris 50 mM, conteniendo un 0,5% de BSA (Sigmal Chemical Company, #A-7888), 0,05% de Tween-20, y EDTA 2 mM), durante dos horas a 25ºC, en un agitador orbital. Se retiró el tampón de dilución con 3 lavados con tampón de lavado de ELISA. Se añadieron a la placa diluciones en serie a la mitad de mutantes de la IgE en tampón de dilución de ELISA. Se añadió IgE de U266 estándar (lote 13068-46) a 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3 y 15,6 ng/ml por duplicado como estándar. Las muestras y el estándar se incubaron dos horas a 25ºC, seguida por tres lavados con tampón de lavado de ELISA. La IgE se detectó con anticuerpo de oveja anti- IgE humana conjugado con HRP (ICN, #N060-050-1), a 1:8000 en tampón de dilución de ELISA, durante 90 minutos a 25ºC, seguida por tres lavados con tampón de lavado de ELISA. El conjugado con HRP se reveló con un sistema de sustrato de peroxidasa de tetrametilbencidina (Kirkegaard & Perry Labs, #5076-00, nº de lote NA 18) durante 7 minutos a 25ºC. Se detuvo la reacción mediante la adición de HCl 1 M. El producto de la reacción se analizó con un espectrofotómetro de doble longitud de onda a 450 nm menos la absorción a 570 nm. Los estándares de IgE de U266 se usaron para generar una curva estándar y las concentraciones de IgE de la muestra se extrapolaron mediante análisis de regresión lineal no paramétrico.

Se usaron líneas celulares B, FcERI alpha (+) CHO 3D10 (expresando el FCEH) y FcERII (CD23) (+) IM9 (expresando el FCEL), para los ensayos de unión. El clon celular 3D10 de CHO (duk-) establemente transfectado (JBC 265:22079-22081 (1990)) se mantuvo en medio de Dulbecco modificado por Iscove, suplementado con un 10% de suero fetal bovino desactivado, 80 μg/ml de sulfato de gentamicina, y metotrexato 5×10^{-7} M. Las células B IM9 de mieloma humano (ATCC CCL 159) (Ann. N.Y. Acad. Sci. 190:221-234 (1972)) se mantuvieron en medio base GIF con un 10% de suero fetal bovino desactivado, penicilina, estreptomicina (100 unidades/ml), y L-glutamina (2 mM). Como control positivo para determinar el nivel de CD23 sobre la superficie de células IM9 en cada experimento, se tiñó una alícuota de células con el monoclonal de ratón Leu 20 (anti-CD23) de Becton Dickinson, a 10 μg/ml, durante 30 minutos a 4ºC, seguida por dos lavados con tampón de FACS. A continuación se incubaron las células con F(ab')2 de cabra, anti-IgG de ratón, purificado por afinidad, conjugado con FITC, a 5 μg/ml. Las células CHO 3D10 adherentes se retiraron de las placas de cultivo de tejidos mediante incubación con EDTA 10 mM en PBS, durante 2 minutos a

37ºC. Se contaron las células, se resuspendieron a continuación en tampón FACS (0,1% BSA, azida sódica 10 mM, en PBS, *p*H 7,4), a una concentración de 5×10^6/ml. Se incubaron células CHO 3D10 e Im9 (5×10^5/alícuota) en 100 μl de tampón FACS que contenía IgE de U266 estándar o mutantes de IgE, a 2 μg/ml, durante 30 minutos a 4ºC, en placas de microvaloración de 96 pocillos, seguida por dos lavados con tampón FACS. Como control, se incubaron las células en tampón solo o tampón conteniendo 2 μg/ml de IgG1 humana (Behring Diagnostics, #400112, lote nº 801024). A continuación se incubaron las células en 100 μl de tampón FACS que contenía anticuerpo de conejo anti-IgE humana, conjugado con FITC, a 20 μg/ml (Accurate Chem. Co., #AXL 475F, lote nº 040A), durante 30 minutos a 4ºC, seguida por 3 lavados con tampón FACS. Se añadieron 400 μl de tampón conteniendo yoduro de propidio a 2 μg/ml a la suspensión de células para teñir las células muertas. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCAN de Becton Dickinson. Las puertas para la dispersión hacia adelante de la luz y la dispersión a 90 grados se ajustaron para analizar una población de células homogénea, y las células muertas que se tiñeron con yoduro de propidio se excluyeron de los análisis. Las células positivas para el FITC (unidoras de la IgE) se analizaron respecto a las células teñidas con FITC-anticuerpo de conejo anti-H IgE solo.

Los ensayos anteriores se usaron para determinar la capacidad de los análogos de la IgE del Ejemplo 2 para unirse al FCEL y FCEH. Los resultados se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3

Unión de la IgE y los análogos de la IgE al FCEH y FCEL

Muestra / mutante	Conc. (µg/ml)	FCEH alpha % CHO 3D10 (+)	FCEL (CD23) % IM9 (+)
IgE de U266	10	90,3	92,5
IgE de U266	5	89,9	82,6
IgE de U266	0,5	59,6	4,6
IgE de U266	0,1	15,8	1,7
1	1,65[1]	1,7	4,3
2	1,65	34,3	48,9
3	1,65	32,3	1,2
4	1,65	4,9	9,2
5	1,65	60,5	73,9
6	1,65	1,4	71,6
7	1,65	76,4	4,6
8	1,65	70,3	16,3
9	1,65	84,2	94,3
10	1,65	67,5	84,8
11	1,65	70,8	61,5
12	1,65	84,7	90,3
13	1,65	85,7	96,1
dh 184 (+)	1,65	83,8	21,1
PA13[2] (control)	10	1,3	

[1] Valores basados en ELISA cuantitativo. Se usó la U266 como estándar y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Fc para capturar.

[2] Una IgG humana con injerto de CDR

Tres mutantes de la IgE presentaron la pérdida completa de la unión al receptor FCEH: los mutantes 1, 4 y 6. El mutante 6 alteró la hebra-β D en el extremo del Fcϵ3, cerca del dominio Fcϵ2. Los mutantes 1 y 4 implicaron la alteración de dos bucles Fcϵ3, los cuales son adyacentes y cercano al dominio Fcϵ4. Hay que destacar que el mutante 7 es un subconjunto del mutante 1 en el que los tres residuos C-terminales del bucle AB han sido cambiados a alaninas (Tabla 2, 1 respecto 7). No obstante, el mutante 7 no afecta la unión al FCEH. Nosotros interpretamos que esto indica que o (1) el FcϵRI se une al menos a los residuos 377-381 de la Ige o (2) el residuo extra en el bucle AB de la IgG1 (9 residuos) sustituido por el bucle AB de la IgE (8 residuos) deformó algunos determinantes de unión adyacentes, posiblemente el bucle EF. Que los mutantes 8 y 10 no tuvieran efecto alguno sobre la unión al FcϵRI indica que lo más probable es que el receptor FCEH no sobresalga hacia dentro de la cavidad limitada por el bucle AB y la hebra-β D.

Aunque el mutante 4 tenía una Leu remplazando la Gly444 (Tabla 2), esto no debería afectar la conformación del bucle EF. El residuo 444 es anterior al extremo N-terminal de esta hélice-α- Además, la IgE de ratón tiene una Val en la posición 444 y la IgE de rata tiene un Asp. Los dos residuos hidrofóbicos enterrados en el medio de la hélice-α, W448 y I449, son retenidos en el bucle IgG1 sustituido (W448 y L449), así como el G451 que termina la hélice-α. Por consiguiente, la conformación del bucle EF debería ser similar en la IgE y en la IgG1.

Los mutantes 2 y 3 exhibieron una unión disminuida al FCEH. Puesto que el bucle BC está cerca de la hebra-β D y el bucle CD está en la proximidad del bucle EF, es concebible que uno o dos residuos en los bucles BC y CD entren en contacto con el FCEH.

Cinco mutantes de la IgE presentaron una pérdida de unión al receptor FCEL: los mutantes 1, 3, 4, 7 y 8. Los mutantes 1 y 4 se han discutido más arriba. El mutante 3 implicó la alteración del bucle CD; en contraste con el FCEH, el bucle CD evidentemente juega un papel principal en la unión al FCEL. El mutante 7, un subconjunto del mutante 1 tal como se ha discutido más arriba, comprende la porción C-terminal del bucle AB y está próximo al bucle EF. Adicionalmente, el bucle 8 consiste en el remplazo de dos residuos Thr (387, 389) con Ala; estos dos residuos son parte de la hebra-β B, la cual está en el fondo de la cavidad antes mencionada, limitada por el bucle AB y la hebra-β D. El mutante 10 incluyó dos residuos diferentes en esta cavidad (438, 440) sobre la hebra-β E, la cual es adyacente a la hebra-β B. Puesto que el mutante 10 no afectó la unión al FCEL, nosotros concluimos que el receptor FCEL debería tener sólo una incursión mínima en la cavidad, mientras que el receptor de alta afinidad no penetra en la cavidad.

Además de un sitio de glicosilación Asn430, que corresponde al sitio de glicosilación en la IgG Fc, la IgE humana contiene otro sitio de glicosilación en Asn403. El mutante 9 convirtió el Asn403 y la Thr405 en alaninas (Tabla 2). La pérdida de carbohidratos no afectó la unión al receptor.

En base a las informaciones de los mutantes 1-13, proponemos que el FCEH y el FCEL tienen sitios de unión sobre la Fc de IgE que son distintos pero que se solapan. El receptor de baja afinidad parece interaccionar con una porción relativamente menor del dominio Fcϵ3 de la IgE, implicando tres bucles adyacentes: AB, CD y EF. Por contra, el receptor de alta afinidad interacciona con una porción mayor del Fcϵ3 de la IgE, la cual abarca el bucle EF, la hebra-β D y, posiblemente, la porción N-terminal del bucle AB. Las porciones de bucles DC y CD en la proximidad del bucle EP y la hebra-β D también podrían interaccionar con el FCEH. Además, el FCEL podría proyectarse hacia dentro de la cavidad limitada por el bucle AB y la hebra-β D. El FCEH no hace tal cosa. Puesto que no hemos evaluado ningún mutante en el Fcϵ4 y sólo uno en el Fcϵ2 (mutante 13), es posible que porciones de estos dos dominios jueguen un papel en la unión al receptor de la IgE.

(Tabla pasa a página siguiente)

Ejemplo 4

Preparación de MAE11 humanizado

Se seleccionaron residuos del MAE11 y se insertaron o sustituyeron en la estructura de un anticuerpo Fab humano (región de la V_H Kabat del subgrupo III y región de la V_L kappa del subgrupo I). Una primera versión, el humae11v1 o versión 1, se describe en la Tabla 4.

TABLA 4

Cambios en las secuencias consenso de la V_H humana del subgrupo III y la V_L κ (Kabat) para la versión 1 del MAE111 humanizado.

Dominio	Residuo hu	Nº de residuo	V.1	CDR según Kabat	CDR según Chothia
V_L					
	M	4	L		
	inserto	30a, b, c, d	YDGD (SEC. Nº ID. 26)	L1	L1
	L*	33	M	L1	
	S	53	Y	L2	
	Y	91	S	L3	L3
	N	92	H	L3	L3
	S	93	E	L3	L3
	L	94	D	L3	L3
V_H					
	A	24	V		
	F*	27	Y	H1	H1
	T	28	S	H1	H1
	F*	29	I	H1	H1
	inserto	29a	T	H1	H1
	D	31	G	H1	H1
	A	33	S	H1	H1
	M*	34	W	H1	H1
	V	37	I		
	V	50	S	H2	
	S	52	T	H2	
	N	53	Y	H2	H2
	G	54	D	H2	H2

TABLA 4					
	S	55	G	H2	H2
	Y	58	N	H2	
	L	78	F		
	D	95	G	H3	
		97-101	Todos cambiados a la secuencia de MAE11	H3	H3
* Estos residuos típicamente no varían a pesar de su posición dentro de los CD. Los residuos restantes hallados en las secuencias de CDR KI y III (particularmente los CDR del análisis estructural de Chothia) variarán ampliamente entre los anticuerpos de receptores humanos.					

Se ensayó la afinidad de la versión 1, y se encontró que era aproximadamente 100 veces inferior a la del anticuerpo donante MAE11 (Ver Figuras 4a y 4b). Por tanto, tal como se muestra en la Tabla 5, se hicieron modificaciones ulteriores en la secuencia de la versión 1. Se realizó la determinación de la capacidad de estas modificaciones ulteriores para inhibir la unión de huIgE marcada al FCEH.

Los ensayos de inhibición al 50% que se muestran en la Tabla 5 se realizaron como sigue:

Se recubrió una placa de ensayo de 96 pocillos (fabricante Nunc) con 0,05 ml del receptor quimérico cadena alfa del FcεRI-IgG1 en 1 μg/ml de tampón de recubrimiento (50 nmoles de carbonato/bicarbonato, *p*H 9,6). El ensayo se realizó durante 12 horas a 4-8ºC. Se aspiraron los pocillos y se añadieron 250 μl de tampón bloqueador (PBS -- 1% BSA, *p*H 7.2), y se incubaron durante una hora a 4ºC. En una placa de ensayo distinta se valoraron las muestras y el anticuerpo MAE11 de ratón de referencia desde 200 μg/ml mediante dilución de 1 a 10 veces en tampón de ensayo (0,5% BSA, 0,05% Tween-20, PBS, *p*H 7,2), y se añadió un volumen igual de IgE biotinilada a 10 ng/ml, y se incubó la placa durante 2-3 horas a 25ºC. Los pocillos recubiertos con FcεRI se lavaron tres veces con PBS-0,05% Tween-20, y a continuación se transfirieron 50 μl de los pocillos de muestras, y se incubaron con agitación, durante 30 minutos a 25ºC. Se incubaron 50 μl/pocillo de estreptoavidina-HRP, diluida 1:5000 en tampón de ensayo, durante 15 minutos con agitación, y a continuación se lavó la placa como antes. Se añadieron 50 μl/pocillo de sustrato de peroxidasa Microwell (Kirkgaard & Parry Laboratories), y se desarrolló el color durante 30 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo un volumen igual de HCl 1 normal, y se midió la absorbancia a 450 nm. La concentración para un 50% de inhibición se calculó representado el porcentaje de inhibición frente a la concentración de anticuerpo bloqueador para cada anticuerpo, con un ajuste a una curva de cuatro parámetros usando INPLOT.

TABLA 5						
Variantes de MAE11 humanizado						
Versión (F(ab)-X]	**Dominio**	**Cambios respecto F(ab')-Versión 1**	**Propósito**	**Conc. al 50% de inh. (ng/ml)* Promedio**	**S.D. para la columna anterior**	**F(ab)-X ------- F(ab)-1**
1	-	-	-	6083	1279	1,0
2	V_L	L4M M33L	Empaqueta-miento: CDR-L1	9439	508	1,6
3	V_L	E55G G57E	Secuencia usualmente	5799	523	1,0

TABLA 5

			E55-X-G57			
4	V_H	I37V	Interfac V_L-V_H	8622	107	1,4
5	V_H	V24A	Empaqueta-miento; CDR-H1	9387	733	1,6
6	V_H	F78L	Empaqueta-miento; CDR-H1; H2	17.537	4372	2,9
7	V_L V_H	L4M R24K E55G G57E V24A I37V T57S A60N D61P V63L G65N F78L	Versión 1 rehecha para conseguir un intercam-bio directo de residuos de CDR	> 100.000		> 16,0#
7a	V_H	Como V.7 excepto que V_H L87 es F		98.000		16,0
8	V_H	A60N D61P	CDR-H2 de Kabat extendido & A60N está en la interfaz V_L-V_H	1224	12	0,20
8a	V_H	Como V.8 excepto	CDR-H2; empaqueta-	416	66	0,07

TABLA 5

		que V_H V63 es L y F67 es I	miento de L63 e I67			
8b	V_H	Como V.8 excepto que F67 es I	CDR-H2; empaqueta-miento de V63 e I67	501	84	0,08
1	-	-	-	6083	1279	1,0
9	V_L V_H	A13V V19A V58I L78V V104L V48M A49G A60N V63L F67I I69V M82L L82cA	re-empaqueta-miento de la versión 1 interior como un MAE11 de ratón	842	130	0,14
23	V_L	L4M	empaqueta-miento; CDR-L1	6770	349	1,1
10	V_L	D30A D30Ab D30dA	modifica-ción del CDR-L1	>100.000		>16,0
11	V_L	E93A D94A	modifica-ción del CDR-L3	17.456	7115	2,9
12	V_H	D54A	modifica-ción del CDR-H2	2066	174	0,34

TABLA 5

13	V_H	H97A H100aA H100cA	modificación del CDR-H3	>100.000		>16,0
14	V_L	D30A	modificación del CDR-L1	3452	183	0,57
15	V_L	D30bA	modificación del CDR-L1	6384	367	1,0
16	V_L	D30dA	modificación del CDR-L1	>100.000		>16,0
17	V_H	H97A	modificación del CDR-H3	19.427	8360	3,2
18	V_H	H100aA	modificación del CDR-H3	2713	174	0,45
19	V_H	H100cA	modificación del CDR-H3	15.846	8128	2,6

* Inhibición de la unión de FITC-IgE al FCEH (FcERI). Anticuerpo de longitud completa y versiones de fragmentos humanizados: promedio y desviación estándar de tres ensayos.
# Una proporción de F(ab)-X/F(ab)-1 de > 16 significa que esta variante no presentó unión alguna incluso a las más altas concentraciones de F(ab) usadas.

Tal como puede observarse a partir de la Tabla 5 y Figuras 4a y 4b, la versión 8 (en la que los residuos humanos de la versión 1 en los sitios 60 y 61 en la cadena ligera han sido remplazados por sus contrapartidas del MAE11) demostró una afinidad sustancialmente incrementada. Se observan mayores incrementos en la afinidad en las versiones 8a y 8b, en donde uno o dos residuos de ratón remplazaron residuos humanos. Otros incrementos, al menos virtualmente hasta el nivel del MAE11 se consiguieron remplazando residuos humanos hidrofóbicos hallados en el interior de la V_H y de la V_{HI} por sus contrapartidas en el MAE11, resultando en la variante denominada versión 9 (ver Tabla 5 y Figuras 4a y 4b). En consecuencia, los anticuerpos humanizados de esta invención poseerán afinidades que oscilarán desde aproximadamente 0,1 hasta 100 veces la del MAE11.

La Tabla 6 explora los efectos sobre la afinidad por el FCEH de varias combinaciones de variantes de la IgG1 MAE11 humanizada.

TABLA 6

Variantes de la IgG1 MAE11 humanizada

Variante	Conc. al 50% de inh. (ng/ml) Promedio*	S.D. para la columna anterior	Var. X -------- IgL1H1	Var. X -------- MAE11
IgL1H1	7569	1042	1,0	16,9
IgL1H8	3493	1264	0,46	7,8
IgL9H9	1118	172	0,15	2,5
IgL1H9	608	364	0,08	1,4
IgL9H1	5273	2326	0,70	11,7
IgL1H8b	1449	226	0,19	3,2
MAE11	449	53	0,06	1,0

* L1 = V_L como en F(ab)-1 (residuos enterrados humanos--no expuestos al solvente); L9 = V_L como en F(ab)-9 (residuos enterrados de ratón); H1 = V_H como en F(ab)-1 (residuos enterrados humanos); H8 = V_H como en F(ab)-8 (F(ab)-1 con AlaH60Asn, AspH61Pro); H9 = V_H como en F(ab)-9 (residuos enterrados de ratón); H8b = V_H como en F(ab)-8b (F(ab)-8 con PheH67Ile).

Ejemplo 5

Creación de mutantes IgE

Se prepararon mutantes IgE (Tabla 7) para evaluar su efecto sobre la unión a anti-IgE, especialmente MAE11, y a FcεRI y FcεRII. Algunos de los mutantes se diseñaron para sustituir un residuo aminoácido específico con otro residuo con carga o tamaño similar o muy diferente. El impacto de estos cambios en la unión al receptor se refleja en la tabla siguiente.

Los ensayos del receptor se realizaron sustancialmente como sigue:

Se recubrió una placa de ensayo de 96 pocillos (fabricante Nunc) con 0,05 ml del receptor quimérico IgG1 FcεRI o RII en 1 μg/ml de tampón de recubrimiento (50 nmoles de carbonato/bicarbonato, *p*H 9,6). El ensayo se realizó durante 12 horas a 4-8ºC. Se aspiraron los pocillos y se añadieron 250 μl de tampón bloqueador (PBS -- 1% BSA, *p*H 7.2), y se incubaron durante una hora a 4ºC. En una placa de ensayo distinta se valoraron las muestras y el anticuerpo MAE11 de ratón de referencia desde 200 μg/ml mediante dilución de 1 a 10 veces en tampón de ensayo (0,5% BSA, 0,05% Tween-20, PBS, *p*H 7,2), y se añadió un volumen igual de IgE biotinilada a 10 ng/ml, y se incubó la placa durante 2-3 horas a 25ºC. Los pocillos recubiertos con FcεRI se lavaron tres veces con PBS-0,05% Tween-20, y a continuación se transfirieron 50 μl de los pocillos de muestras, y se incubaron con agitación, durante 30 minutos a 25ºC. Se incubaron 50 μl/pocillo de estreptoavidina-HRP, diluida 1:5000 en tampón de ensayo, durante 15 minutos con agitación, y a continuación se lavó la placa como antes. Se añadieron 50 μl/pocillo de sustrato de peroxidasa Microwell (Kirkgaard & Parry Laboratories), y se desarrolló el color durante 30 minutos. Se detuvo la reacción añadiendo un volumen igual de HCl 1 normal, y se midió la absorbancia a 450 nm. Se representó la absorbancia frente a la concentración de anticuerpo MAE11 bloqueador y se generó una curva estándar de inhibición usando INPLOT.

TABLA 7

Secuencias de aminoácidos de los mutantes de la IgE

Mutante	# Residuo de Kabat	Sec. Fce3 de IgE humana	Sec. mutante	Fcε-RI*	Fcε-RII*
Bucle AB					
1	377-385	FDLFIRKS (SEC. Nº ID 27)	KDTLMISRT (SEC. Nº ID 27)	-	-
7	383-385	RKS	AAA	+/-,-	+,-
21	377, 381	F(DL)F (SEC. Nº ID 29)	Q(DL)H (SEC. Nº ID 30)	+	+
66	382	I	A	+	+
67	383	R	A	+	+/-
68	384	K	A	+	+
69	385	S	A		
102	383, 384	RK	DD		
hebra-β B					
8	387, 389	T(I)T	A(I)A	+/-, +	-
70	387	T	A	+	+/-, +
71	389	T	A	+	+
Bucle BC					
2	396-401	APSKGT	SHEDPQ		

TABLA 7

		(SEC. Nº ID. 31)	(SEC. Nº ID. 32)		
Hebra-β C					
9	403, 405	N(L)T	A(L)A	+	+
Bucle CD					
3	407-420	SRASGKPVNHS (SEC. Nº ID. 33)	YVDGVQVHNAK (SEC. Nº ID. 34)	+/-	-
55	407-415	SR(A)S(G)K (SEC. Nº ID. 35)	AA(A)A(G)A (SEC. Nº ID. 36)	+/-	+
59	407	S	A	+	+
60	408	R	A	+	-
61	411	S	A	+	+
62	415	K	A	+	-
63	418	N	A	+/-	+
64	419	H	A	+	+
65	420	S	A	+/-	+
100	408	R	E		
101	415	K	D		
hebra-β D					
6	423-428	KEEKQR (SEC. Nº ID. 31)	PREQQY (SEC. Nº ID. 31)	+	+
35	422	R	A	+	+
36	423	K	A	+	+
37	424	E	A	+	+
38	425	E	A	+	+
39	426	K	A	+	
40	427	Q	A	-, +/-	+
41	428	R	A	+	+
75	423-425	KEE	AAA	-, +/-, +	+
76	426-428	KQR	AAA		
79	423, 425,	KEEKQR	AEAKAR		

TABLA 7

	427	(SEC. Nº ID. 39)	(SEC. Nº ID. 40)		
80	424, 426, 428	KEEKQR (SEC. Nº ID. 41)	KAEAQA (SEC. Nº ID. 42)		
81	423	K	P		
82	423-427	KEEKQR (SEC. Nº ID. 43)	AAEAQA (SEC. Nº ID. 44)		
hebra-β E					
10	438, 440	T(S)T	A(S)A	+	+
Bucle EF					
4	444-453	GTRDWIEGET (SEC. Nº ID. 45)	LHQDWLDGKE (SEC. Nº ID. 46)	-	-
49	445	T	A	+	+
50	336	R	A	+	-
51	337	D	A	+	+, -
52	450	E	A	+/-	
53	452	E	A	+	-
77	445, 446	TR	A	+	+
78	450, 452, 453	E(G)ET (SEC. Nº ID. 47)	A(G)AA (SEC. Nº ID. 48)	+	+/-
83	444	G	L	-	-
84	444	G	A	++	+
85	445-453	TRDWIEGET (SEC. Nº ID. 49)	HQDWLDGKE (SEC. Nº ID. 50)	+	+
86	445	T	H	-	+
87	445, 446	TR	HQ	+	
88	446	R	E	+	
89	450, 452, 453	E(G)ET (SEC. Nº ID.	D(G)KE (SEC. Nº ID.	+/-, +	

TABLA 7

		51)	52)		
93	447	D	R	-	
94	450	E	R	+/-, -	+/-
95	452	E	R	+	
96	453	T	R	+/-, -	
97	447	D	N		
98	452	E	Q		
Bucle EF					
99	452	E	D		
Hebra-β F					
11	445, 457, 459	Q(C)R(V)T (SEC. Nº ID. 53)	A(C)A(V)A (SEC. Nº ID. 54)		
Bucle FG					
5	465-469	RALM (SEC. Nº ID. 55)	APIE (SEC. Nº ID. 56)		
Hebra-β G					
12	471, 473	S(T)T	A(T)A	+, +	
Fcε2					
13	329-331, 334-336	QKH(WL)SDR (SEC. Nº ID. 57)	AAA(WL)AAA (SEC. Nº ID. 58)	+, +	
Fcε3					
72	498-501	PRAA (SEC. Nº ID. 59)	QPRE (SEC. Nº ID. 60)		
73	594-599	ASPSQT (SEC. Nº ID. 61)	LHNHY (SEC. Nº ID. 62)		
74	595-599	S(P)SQT (SEC. Nº ID. 63)	A(P)AAA (SEC. Nº ID. 64)		

* Unión positiva al receptor indicada por "+", ausencia de unión por "-", y la unión positiva pero menor que la no alterada se muestra como "+/-". Cuando se realizó más de un ensayo, los resultados están separados por comas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante sólo es para provecho del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tenido sumo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 8906138 A [0003]
- US 4940782 A [0003]
- US 4816567 A [0003]
- WO 9109968 A [0003]
- EP 452508 A [0003]
- WO 9116927 A [0003]

Literatura, que no son patentes, citada en la descripción

- **BURT** *et al*. *Eur. J. Immun*, 1987, vol. 17, 437-440 [0005]
- **HELM** *et al*. *Nature*, 1988, vol. 331, 180-183 [0005]
- **HELM** *et al*. *Proc, Natl. Acad. Sci.*, 1989, vol. 86, 9465-9469 [0005]
- **VERCELLI** *et al*. *Nature*, 1989, vol. 338, 649-651 [0005] [0007]
- **NIO** *et al*. *Peptide Chemistry,* 1990, 203-208 [0005]
- **BURT** *et al*. *Molec. Immun*, 1987, vol. 24, 379-389 [0005]
- **ROBERTSON** *et al*. *Molec. Immun*., 1988, vol. 25, 103-113 [0005] [0009]
- **BANIYASH** *et al*. *Molec. Immun*., 1988, vol. 25, 705-711 [0005]
- **BURT** *et al*. *Bur. J. Immun*., 1987, vol. 17, 437-440 [0005]
- **HELM** *et al*. *Proc. Natl. Acad. Sci*., 1989, vol. 86, 9465-9469 [0006]
- **HELM** *et al*. *Proc. Natl. Acad Sci*., 1989, vol. 86, 9465-9469 [0006]
- **PADLAN** *et al*. *Mol. Immun.*, 1986, vol. 23, 1063 [0006]
- **KABAT** *et al*. Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, 1987 [0006]
- **BURT** *et al*. *Eur. J. Immun*., 1987, vol. 17, 437-440 [0008]
- **NIO** *et al*. *peptide Chemistry*, 1990, 203-208 [0010]
- **SCHWARZBAUM** *et al*. *Eur, J. Immun.*, 1989, vol. 19, 1015-1023 [0011]
- **WEETALL** *et al*. *J. Immunol*., 1990, vol. 145, 3849-3854 [0011]
- **KULCZYCKI** JR. *et al*. *J. Exp. Med*., 1974, vol. 139, 600-616 [0012]
- **CONRAD** *et al*. *J, Immun*., 1983, vol. 130, 327-333 [0012]
- **WEETALL** *et al*. *J. Immun.*, 1990, vol. 145, 3849-3854 [0012] [0012]
- **NISSIM** *et al*. *EMBO J*., 1991, vol. 10, 101-107 [0013]
- **SCHWARZBAUM** *et al*. *Eur. J. Immun.*, 1989, vol. 19, 1015-1023 [0014]
- **PADLAN** *et al*. *Molec. Immun.*, 1986, vol. 23, 1063-1075 [0022]

- **ISHIZAKA** *et al*. *Immunochemistry*, 1973, vol. 7, 687-702 [0028]
- **CAPRON** *et al*. *Immun. Today*, 1986, vol. 7, 15-18 [0028]
- **GLENNIE** *et al*. *Nature*, 1982, vol. 295, 712 [0035]
- **HAKIMI** *et al*. *J. Biol. Chem*., vol. 265, 22079 [0057] Ann, N,Y, Acad, Sci., 1972, vol. 190, 221-234 [0057]
- **PADLAN**; **DAVIES**. *Mol. Immunol.*, 1986, vol. 23, 1063 [0058]
- **DEISENHOFER**. *Biochem.*, 1981, vol. 20, 2361-2370 [0058]
- **GORMAN** *et al*. *DNA and Prot. Eng, Techn*., 1990, vol. 2, 3-10 [0059]
- T.A. **KUNKEL**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 48B-492 [0059]
- *JBC*, 1990, vol. 265, 22079-22081 [0063]
- *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1972, vol. 190, 221-234 [0063]

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que es capaz de unirse a la IgE unida a FcϵRII pero es sustancialmente incapaz de unirse a la IgE unida a FcϵRI, que comprende al menos una región Fab de un anticuerpo receptor humano, en el que se han sustituido en una o más de las posiciones 30, 30b, 30d, 33, 53, 91, 92, 93 y 94 en la cadena ligera, y de las posiciones 27, 28, 29, 29a, 31, 33, 34, 50, 52, 53, 54, 55, 58, 95, 97, 98, 99, 100 y 101 en la cadena pesada, residuos procedentes de posiciones análogas en un anticuerpo donante MAE11, MAE13 o MAE15, que tiene las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada tal como se detallan en las SEC. Nº ID. Nº 2 a 7, o un anticuerpo donante que tiene las características poseídas por el anticuerpo MAE11, en particular, la unión de la IgE soluble, la unión de células B portadoras de IgE, el bloqueo de la unión de la IgE a FcϵRI y FcϵRII, la inhibición *in vitro* de la producción de IgE, y la incapacidad de unirse a basófilos recubiertos con IgE, para su uso en terapias.

2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo donante es el MAE11.

3. Anticuerpo según la reivindicación 1 ó reivindicación 2, en donde el anticuerpo humano receptor tiene una cadena kappa (ligera) humana del subgrupo I de Kabat, y una cadena pesada humana del subgrupo III.

4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes el cual es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

5. Anticuerpo según la reivindicación 4 el cual es un anticuerpo IgG unidor de complemento, o un anticuerpo IgG capaz de participar en la ADCC.

6. Anticuerpo que comprende las secuencias de cadena pesada y ligera del Fab del humae11ver.1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 7a, 8, 8a, 8b o 9, en donde el humae11ver.1 tiene las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y ligera tal como se detallan en las SEC. Nº ID.: 8 y 9, y los humae11ver.2-9 tienen las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera del humae11ver.1, que incorporan además las modificaciones mostradas en la Tabla 5.

7. Anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera del Fab del humae11ver.1 tal como se detallan en la SEC. Nº ID.: 8 y 9, estando sustituida dicha cadena pesada en la posición 60 con asparagina, en la posición 61 con prolina, y en la posición 67 con isoleucina.

8. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que tiene adicionalmente la sustitución de uno o más residuos estructurales del anticuerpo donante en posiciones seleccionadas de entre la 4, 13, 19, 33, 53, 58, 78 y 104 de la cadena ligera, y la 24, 37, 50, 52, 58, 60, 61, 95, 78, 48, 49, 63, 67, 69, 82 y 82c de la cadena pesada.

9. Anticuerpo según la reivindicación 8, que tiene residuos hidrofóbicos estructurales de donante en las posiciones 13, 19, 58, 78 y 104 de la cadena ligera, y 48, 49, 63, 67, 69, 78, 82 y 82c en la cadena pesada.

10. Anticuerpo según la reivindicación 8, que tiene residuos donantes en 4, 33 y 53 de la cadena ligera, y 24, 37, 50, 52, 58, 60, 61 y 95 de la cadena pesada.

11. Anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 10, que tiene la sustitución, supresión o inserción de un residuo de un anticuerpo donante en, o adyacente a los sitios 30, 30b, 30d, 33, 55, 57, 58, 78, 93, 94 o 104 de la cadena ligera, y/o los sitios 24, 37, 48, 49, 54, 57, 60, 61, 63, 65, 67, 69, 78, 82, 82c, 97, 100a o 100c de la cadena pesada.

12. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 78 se sustituye por fenilalanina.

13. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 78 se sustituye por leucina, valina, isoleucina, metionina o alanina.

14. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 60 se sustituye por asparagina.

15. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 60 se sustituye por glutamina, histidina, lisina o arginina.

16. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 61 se sustituye por prolina.

17. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde el V_H 61 se sustituye por glicina, alanina, valina, leucina o isoleucina.

18. Anticuerpo según la reivindicación 8, en donde los residuos se importan del MAE11 donante, incluyendo cuatro insertos en V_{L1} 30a-30d, así como V_{L3} 91-94, V_{H1} 27-29, 29a, 31, 33 y 34, V_{H2} 53-55 y V_{H3} 97-101.

19. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde cualquiera de las posiciones V_H 97, 100a y 100c tiene un residuo básico distinto de la histidina, preferiblemente lisina o arginina.

20. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde cualquiera de las posiciones V_H 97, 100a y 100c tiene un residuo seleccionado de entre alanina, glicina, valina, isoleucina, serina, treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano o prolina.

21. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde cualquiera de las posiciones V_L 30, 30b y 30d es ácido glutámico.

22. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde cualquiera de las posiciones V_L 30, 30b y 30d tiene un residuo seleccionado de entre alanina, glicina, valina, isoleucina, serina, treonina, asparagina, glutamina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano o prolina.

23. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde cualquiera de los residuos de V_L en las posiciones 30, 30b y 30d es histidina, y cualquiera de los residuos de V_H en las posiciones 97, 100a o 100c es ácido aspártico.

24. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde los residuos se insertan adyacentes a cualquiera de los residuos de V_H en las posiciones 97, 100a, 100c, 60 ó 61, o de los residuos de V_L en las posiciones 30, 30b, 30d ó 78.

25. Anticuerpo según la reivindicación 24, en donde los residuos insertados son del mismo tipo, esto es, residuos ácidos insertados adyacentes a V_L 30, 30b ó 30d, o residuos básicos adyacentes a V_H 97, 100a ó 100c.

26. Anticuerpo según la reivindicación 11, en donde los residuos en cualquiera de V_L 30, 30b ó 30d ó 78, o de V_H 97, 100a, 100c, 60 ó 61 se suprimen.

27. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un anticuerpo biespecífico.

28. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es monovalente para la IgE unida a FcϵRII, y es capaz de una función efectora de imunoglobulina, y comprende un dominio Fc que contiene al menos dos cadenas pesadas.

29. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende una cadena pesada consenso humana y una secuencia de cadena ligera.

30. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene una afinidad por la IgE que es sustancialmente la misma que, o superior que la del MAE11 por la IgE.

31. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de las alergias.

32. El uso según la reivindicación 32, en donde el medicamento es para su administración a un paciente que está sensibilizado a un alérgeno.

33. El uso según la reivindicación 33, en donde el medicamento es para su administración antes de una respuesta alérgica aguda.

34. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en donde el medicamento es para su administración mediante la ruta intravenosa, intaperitoneal o subcutánea.

35. El uso según la reivindicación 34, en donde el medicamento es para su administración subcutánea.

36. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, en donde el medicamento es para su uso conjuntamente con una terapia adicional para el tratamiento de alergias.

37. El uso según la reivindicación 36, en donde la terapia adicional es la administración de interferón gamma, la desensibilización al alérgeno, la reducción en la exposición al alérgeno, o la administración de antihistamínicos.

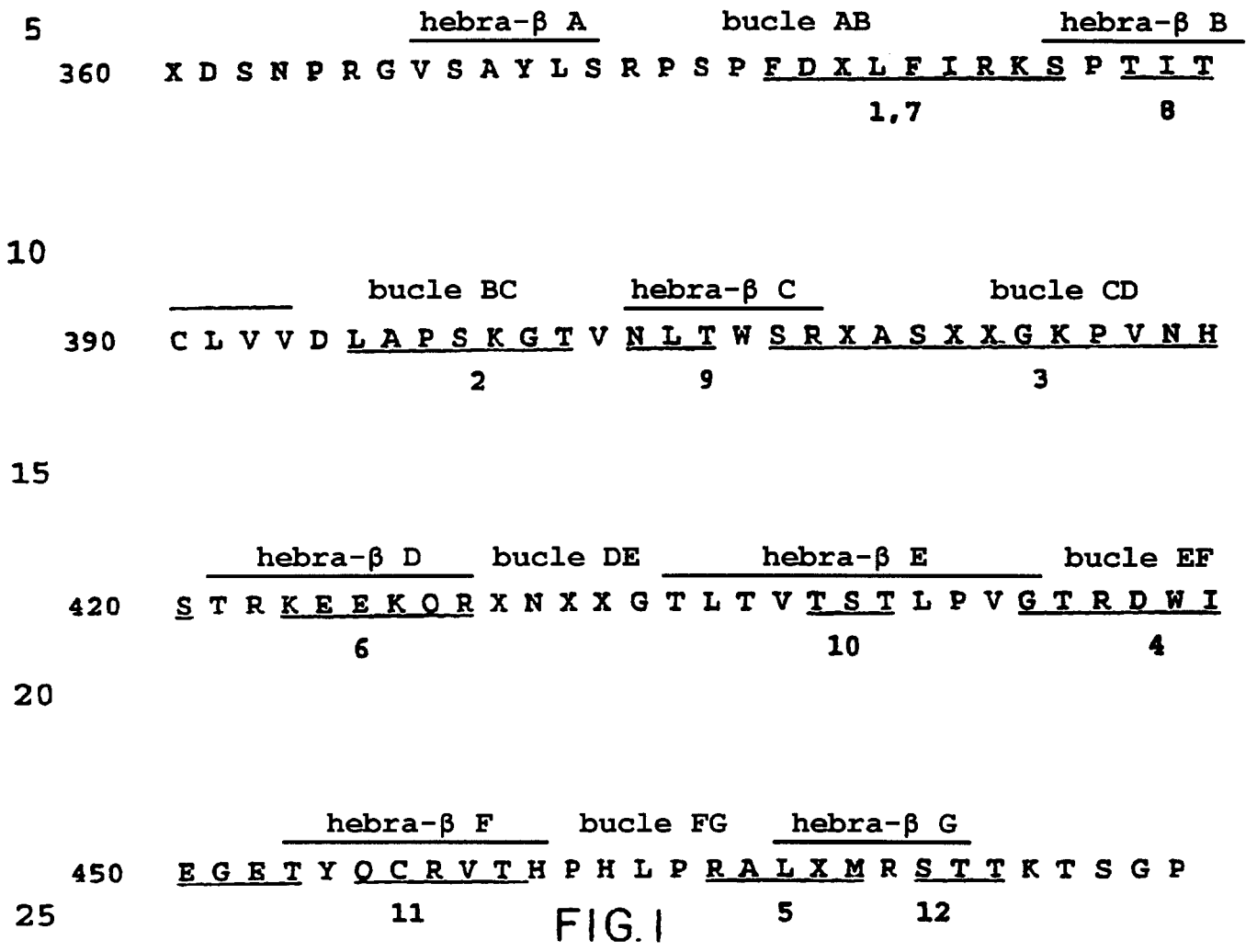

hebra-β A
bucle AB
hebra-β B
360 X D S N P R G V S A Y L S R P S P F D X L F I R K S P T I T
1,7
8
bucle BC
hebra-β C
bucle CD
390 C L V V D L A P S K G T V N L T W S R X A S X X G K P V N H
2
9
3
hebra-β D
bucle DE
hebra-β E
bucle EF
420 S T R K E E K Q R X N X X G T L T V T S T L P V G T R D W I
6
10
4
hebra-β F
bucle FG
hebra-β G
450 E G E T Y Q C R V T H P H L P R A L X M R S T T K T S G P
11
5
12

FIG.1

Cadena ligera de MaE11

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLG
SEIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

Cadena pesada de MaE11

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSS
NYNPSLKNRISVTRDTSQNQFFLKLNSATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVT
VSSAKTTPPSVYPLAR

Cadena ligera de Mae13

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVSSNVAWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYYTYPLYTFGGGTKLEIKRADAAPTVSI
FPPSTR

Cadena pesada de Mae13

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYTITSDNAWNWIRQFPGNKLEWMGYINHSGTT
SYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAWVVAYAMDYWGQGTSVTVSSA
KTTPPSVYPLAR

Cadena ligera de Mae15

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPFTFGAGT

Cadena pesada de Mae15

DVQHQESEPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYNRHWIRQFPGNKLEWMGYIHYSGST
NYNPSLKRRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGSIYYYGSRYRYFDVWGAGT
TVTVSSAKRHPHLSIHWPG

FIG. 2

MaE11 humanizado Versión 1 (IgG intacta)

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
ADSVKGRFTISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGTLVTVS
SASTKGKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG.3

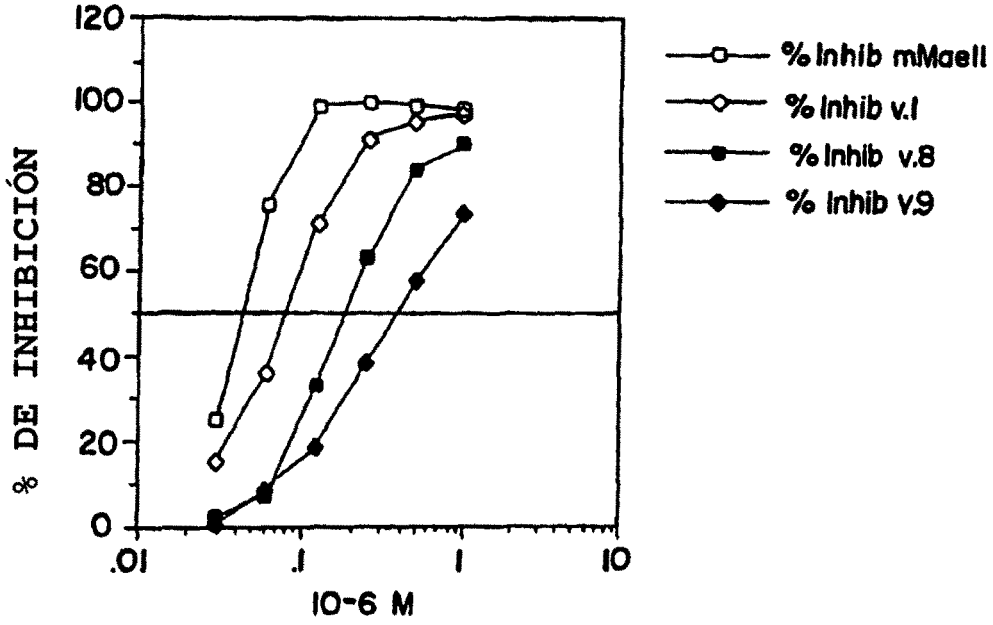

120
100
80
60
40
20
0
% DE INHIBICIÓN
.01
.1
1
10
10-6 M
% Inhib mMaeII
% Inhib v.I
% Inhib v.8
% Inhib v.9

FIG.4a

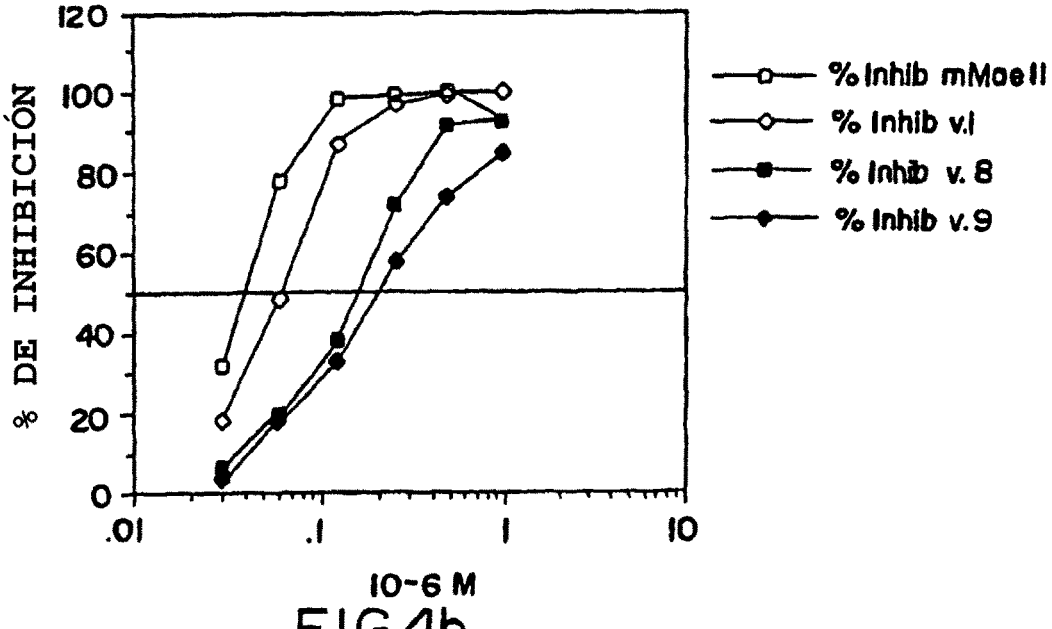

120
100
80
60
40
20
0
% DE INHIBICIÓN
.01
.1
1
10
10-6 M
% Inhib mMaeII
% Inhib v.I
% Inhib v. 8
% Inhib v.9

FIG.4b

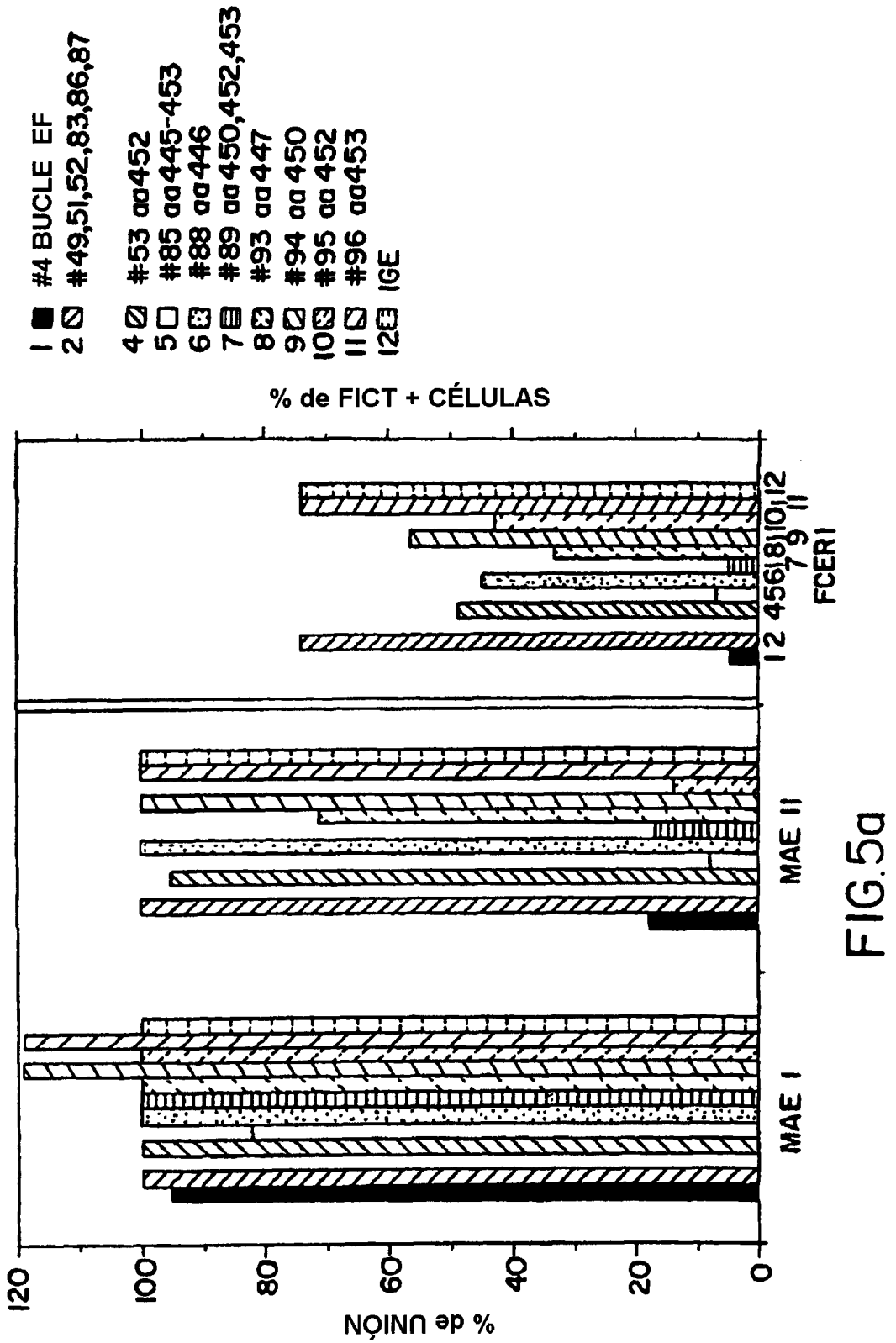

1 #4 BUCLE EF
2 #49,51,52,83,86,87
4 #53 aa452
5 #85 aa445-453
6 #88 aa446
7 #89 aa 450,452,453
8 #93 aa 447
9 #94 aa 450
10 #95 aa 452
11 #96 aa453
12 IGE
% de FICT + CÉLULAS
% de UNIÓN
120
100
80
60
40
20
0
MAE I
MAE II
FCERI
1 2 4 5 6 8 7 9 10 11 12

FIG.5a

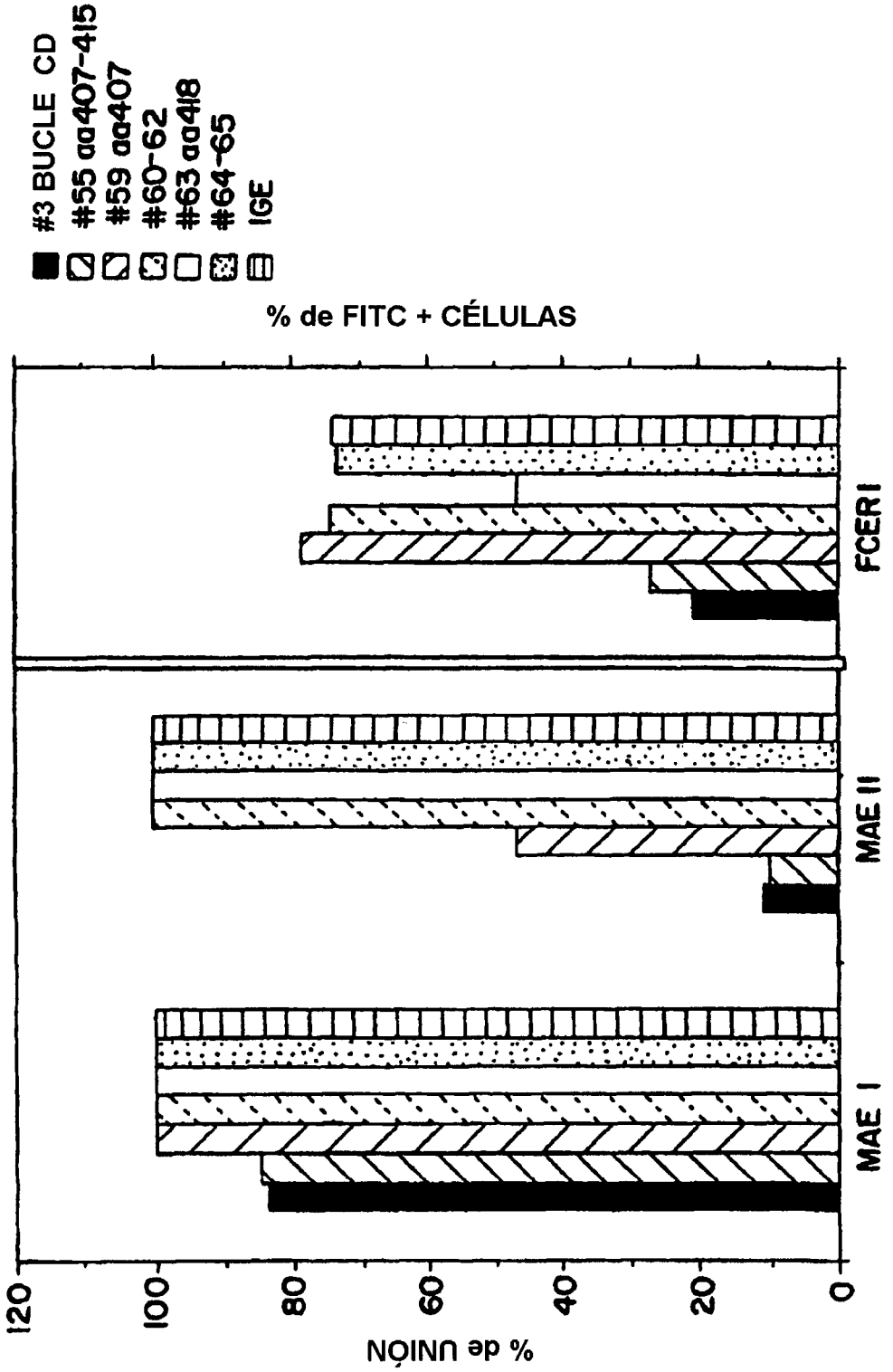

#3 BUCLE CD
#55 aa407-415
#59 aa407
#60-62
#63 aa418
#64-65
IGE
% de FITC + CÉLULAS
FCERI
MAE II
MAE I
120
100
80
60
40
20
0
% de UNIÓN

FIG.5b

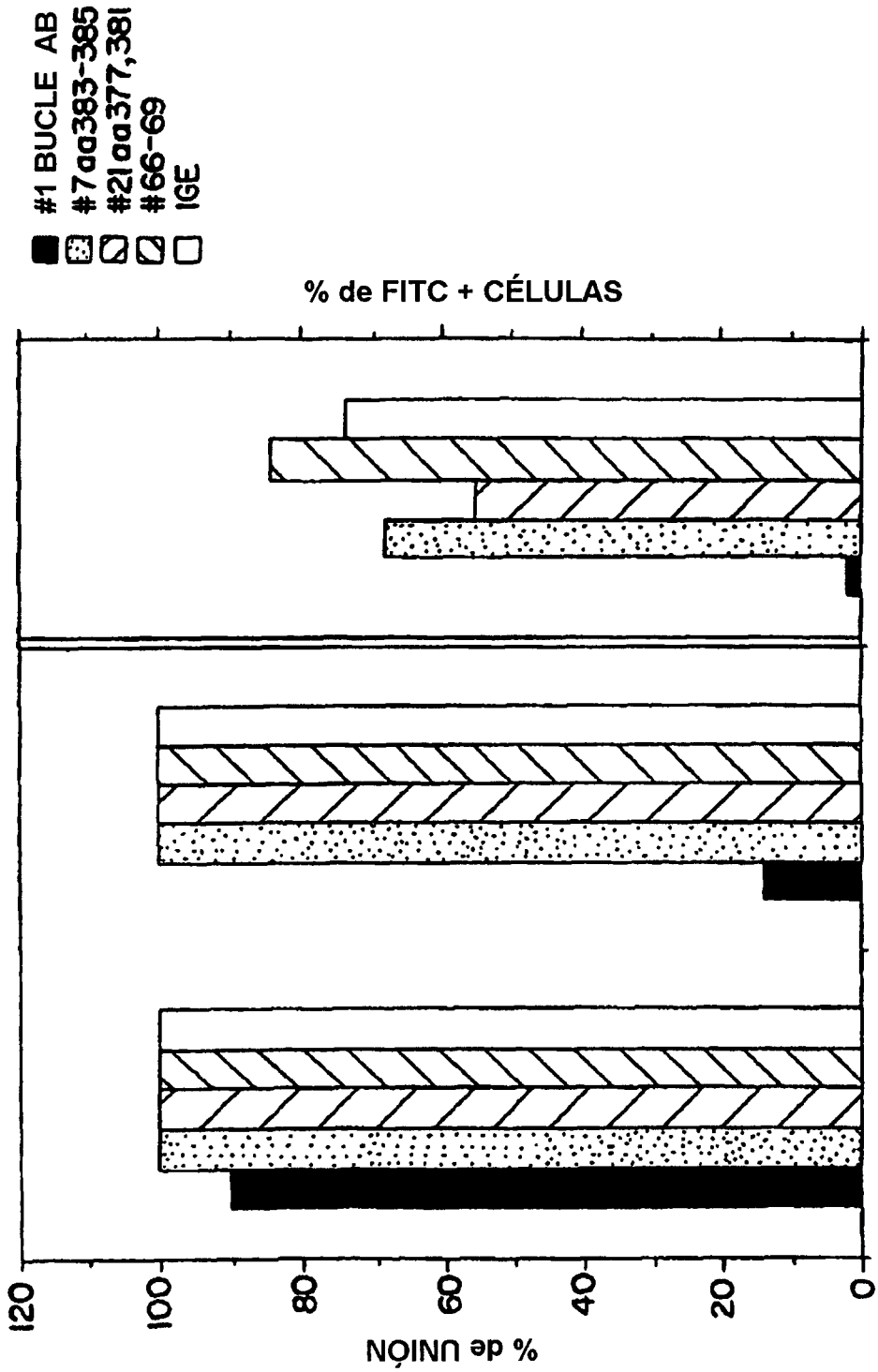

#1 BUCLE AB
#7aa383-385
#21aa377,381
#66-69
IGE
% de FITC + CÉLULAS
FCERI
MAE II
MAE I
% de UNIÓN
120
100
80
60
40
20
0

FIG.5c

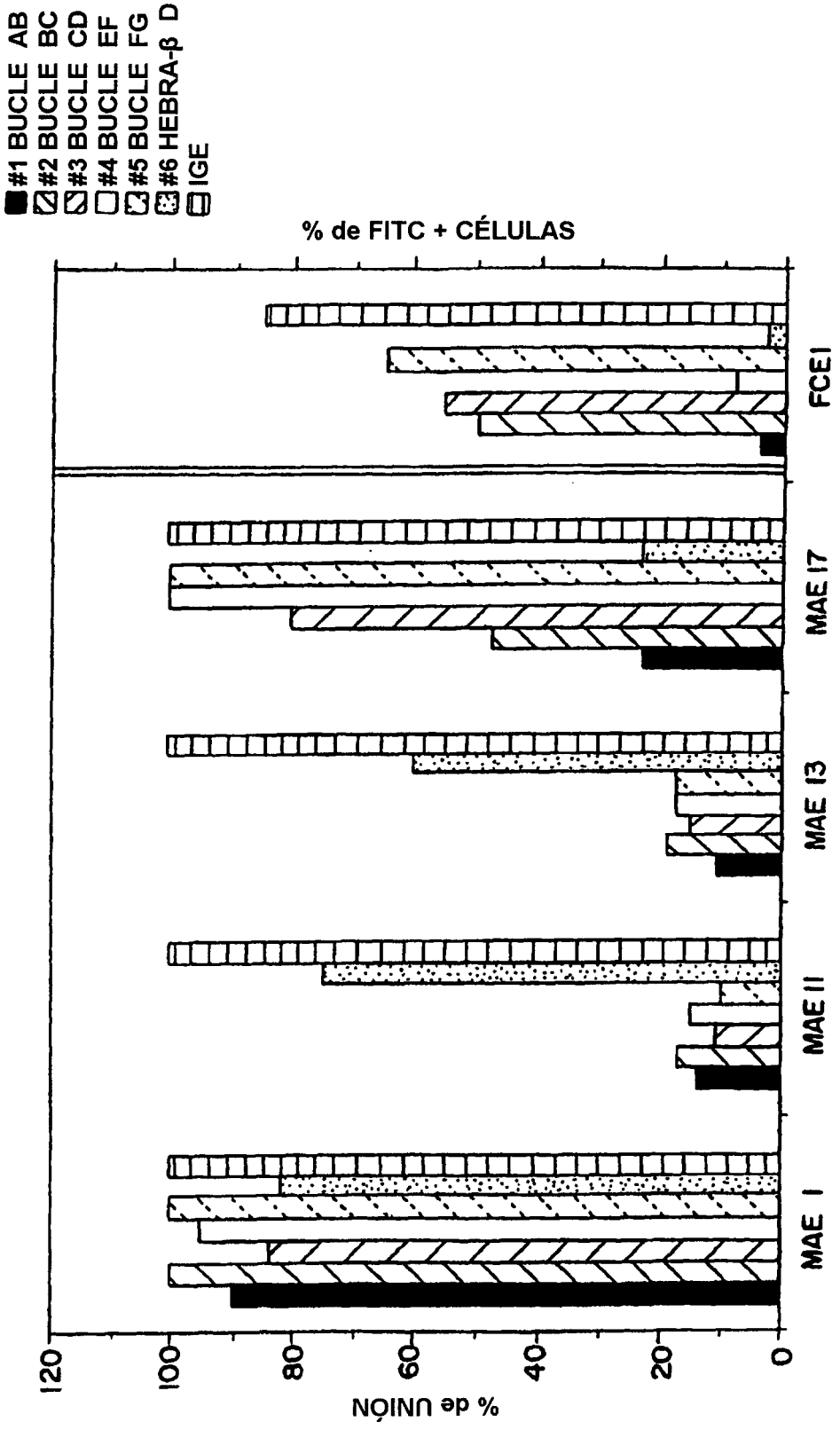

#1 BUCLE AB
#2 BUCLE BC
#3 BUCLE CD
#4 BUCLE EF
#5 BUCLE FG
#6 HEBRA-β D
IGE
% de FITC + CÉLULAS
FCE1
MAE 17
MAE 13
MAE 11
MAE 1
120
100
80
60
40
20
0
% de UNIÓN

FIG.5d

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Jardieu, Paula M.
Presta, Leonard G.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Variantes de inmunoglobulina.

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 64

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA

(A) NOMBRE: Genentech, Inc.
(B) CALLE: 460 Point San Bruno Blvd
(C) CIUDAD: South San Francisco
(D) ESTADO: California
(E) NACIÓN: USA
(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 94080

(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete de 360 kB, de 5,25 pulgadas
(B) ORDENADOR: Compatible con IBM PC
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMA: patin (Genentech)

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE REGISTRO: 14-AGOSTO-1992
(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/879495
(B) FECHA DE REGISTRO: 07-MAYO-1992

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: 07/744768
(B) FECHA DE REGISTRO: 14-AUG-1991

(viii) INFORMACIÓN DEL AGENTE/ABOGADO:

(A) NOMBRE: Adler, Carolyn R.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.324
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 718P2

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: 415/225-2614
(B) TELEFAX: 415/952-9881
(C) TELEX: 910/371-7168

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 118 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:1:

```
Xaa Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro
 1               5                  10                  15

Ser Pro Phe asp Xaa Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr
            20                  25                  30

Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu
            35                  40                  45

Thr Trp Ser Arg Xaa Ala Ser Xaa Xaa Gly Lys Pro Val Asn His
            50                  55                  60

Ser Thr Arg Lys Glu glu Lys Gln Arg Xaa Asn Xaa Xaa Gly Thr
            65                  70                  75

Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile
            80                  85                  90

Glu Gly Glu Thr Gln Cys Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg
            95                 100                 105

Ala Leu Xaa Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
           110                 115         118
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 111 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:2:

```
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1               5                  10                  15

Gly Gln arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
            20                  25                  30

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
            35                  40                  45

Gln Pro Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser
            50                  55                  60

Glu Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
            65                  70                  75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Phe
            80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly
            95                  100                 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            110 111
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 134 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:3:

```
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1               5                  10                  15

Gln Ser Leu Ser Leu Ala Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asa Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
            35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr
            50                  55                  60

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser
            65                  70                  75

Gln Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asp
            80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
            95                 100                 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
           110                 115                 120

Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Arg
           125                 130             134
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 124 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:4:

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val
 1               5                  10                  15

Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Ser
            20                  25                  30

Ser Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
            35                  40                  45

Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp
            50                  55                  60

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
            65                  70                  75

Ser Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln
            80                  85                  90

Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
            95                 100                 105

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro
           110                 115                 120

Pro Ser Thr Arg
       124
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 130 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:5:

```
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1               5                  10                  15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Thr Ile Thr
            20                  25                  30

Ser Asp Asn Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
            35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn His Ser Gly Thr Thr Ser Tyr
            50                  55                  60

Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser
            65                  70                  75

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
            80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Trp Val Val Ala Tyr Ala Met Asp
            95                 100                 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
           110                 115                 120

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Arg
           125                 130
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 106 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:6:

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
 1               5                  10                  15

Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp
            20                  25                  30

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
            35                  40                  45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
            50                  55                  60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
            65                  70                  75
Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
            80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly
            95                 100                 105

Thr
106
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 137 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:7:

```
Asp Val Gln His Gln Glu Ser Glu Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser
 1               5                  10                  15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Tyr Asn Arg His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
            35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr
            50                  55                  60

Asn Pro Ser Leu Lys Arg Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser
            65                  70                  75

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
            80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Ile Tyr Tyr Tyr Gly
            95                 100                 105

Ser Arg Tyr Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
           110                 115                 120

Thr Val Ser Ser Ala Lys Arg His Pro His Leu Ser Ile His Trp
           125                 130                 135

Pro Gly
    137
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 453 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:8:

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1               5                  10                  15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
            20                  25                  30

Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
            35                  40                  45

Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr
            50                  55                  60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
            65                  70                  75

Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
            80                  85                  90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His
            95                 100                 105

Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
           110                 115                 120
```

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
125 130 135

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
140 145 150

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
155 160 165

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
170 175 180

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
185 190 195

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
200 205 210

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
215 220 225

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

290 295 300

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
320 325 330

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
335 340 345

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
350 355 360

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
365 370 375

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
380 385 390

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
395 400 405

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
410 415 420

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
425 430 435

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
440 445 450

Pro Gly Lys
453

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 218 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:9:

```
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1               5                  10                  15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp
            20                  25                  30

Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
        35                  40                  45

Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
    50                  55                  60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65                  70                  75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
            80                  85                  90

Tyr Cys gln Gln Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
        95                  100                 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
    110                 115                 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
```

```
                    125                 130                 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
                    140                 145                 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
                    155                 160                 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                    170                 175                 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
                    185                 190                 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser pro Val Thr
                    200                 205                 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                    215         218
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:10:

```
Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser
1                   5           8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:11:

```
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
1                   5               9
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:12:

```
Ala Pro Ser Lys Gly Thr
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:13:

```
Ser His Glu Asp Pro Gln
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:14:

```
Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser
1               5                   10  11
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:15:

```
Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys
1               5                   10  11
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:16:

```
Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr
1               5                  10
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:17:

```
Leu His Gln Asp Trp Leu Asp Gly Lys Glu
1               5                  10
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:18:

```
Arg Ala Leu Met
1           4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:19:

```
Ala Pro Ile Glu
1           4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:20:

```
Lys Glu Glu Lys Gln Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:21:

```
Pro Arg Glu Gln Gln Tyr
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:22:

```
Gln Cys Arg Val Thr
1               5
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:23:

```
Ala Cys Ala Val Ala
1               5
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:24:

```
Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg
1               5               8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:25:

```
Ala Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala
1               5               8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:26:

```
Tyr Asp Gly Asp
1           4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 8 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:27:

```
Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser
1               5               8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:28:

```
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
1               5                   9
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:29:

Phe Asp Leu Phe
1 4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:30:

Gln Asp Leu His
1 4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:31:

Ala Pro Ser Lys Gly Thr
1 5 6

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:32:

Ser His Glu Asp Pro Gln
1 5 6

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:33:

Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser
1 5 10 11

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:34:

```
Tyr Val Asp Gly Val Gln Val His Asn Ala Lys
1               5                  10  11
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:35:

```
Ser Arg Ala Ser Gly Lys
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:36:

```
Ala Ala Ala Ala Gly Ala
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:37:

```
Lys Glu Glu Lys Gln Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:38:

```
Pro Arg Glu Gln Gln Tyr
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:39:

```
Lys Glu Glu Lys Gln Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:40:

```
Ala Glu Ala Lys Ala Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:41:

```
Lys Glu Glu Lys Gln Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:42:

```
Lys Ala Glu Ala Gln Ala
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:43:

```
Lys Glu Glu Lys Gln Arg
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:44:

```
Ala Ala Glu Ala Gln Ala
1               5   6
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:45:

```
Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr
1               5                  10
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 10 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:46:

```
Leu His Gln Asp Trp Leu Asp Gly Lys Glu
1               5                  10
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 4 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:47:

```
Glu Gly Glu Thr
1               4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:48:

```
Ala Gly Ala Ala
1               4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:49:

```
Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr
1                   5                   9
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:50:

```
His Gln Asp Trp Leu Asp Gly Lys Glu
1                   5                   9
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:51:

Glu Gly Glu Thr
1 4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:52:

Asp Gly Lys Glu
1 4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:53:

Gln Cys Arg Val Thr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:54:

Ala Cys Ala Val Ala
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:55:

Arg Ala Leu Met
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:56:

```
Ala Pro Ile Glu
1               4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 8 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:57:

```
Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg
1                   5           8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 8 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:58:

```
Ala Ala Ala Trp Leu Ala Ala Ala
1                   5           8
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:59:

```
Pro Arg Ala Ala
1               4
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:60:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 4 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:60:

Gln Pro Arg Glu
1 4

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:61:

Ala Ser Pro Ser Gln Thr
1 5 6

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:62:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:62:

Leu His Asn His Tyr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:63:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:63:

Ser Pro Ser Gln Thr
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC. Nº ID.:64:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
(A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC. Nº ID.:64:

Ala Pro Ala Ala Ala
1 5