

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 499 031**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 09792678 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2331578**

54 Título: **Novedosas composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por la IgE**

30 Prioridad:

17.09.2008 US 97819 P

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

26.09.2014

73 Titular/es:

**XENCOR, INC. (100.0%)
111 W. Lemon Avenue
Monrovia, CA 91016, US**

72 Inventor/es:

**DESJARLAIS, JOHN R.;
CHU, SEUNG Y. y
HORTON, HOLLY M.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 499 031 T3

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

DESCRIPCIÓN

Novedosas composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por la IgE

5 Campo técnico

La presente descripción se refiere a composiciones de inmunoglobulinas que se unen a la IgE y al FcγRIIb con alta afinidad, dichas composiciones son capaces de inhibir las células que expresan la IgE anclada a la membrana. Tales composiciones son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por la IgE, que incluyen las alergias y el asma.

10 Antecedentes de la invención

15 Las enfermedades y afecciones alérgicas, tales como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica y la alergia a los alimentos, se han vuelto cada vez más prevalentes durante las últimas décadas y ahora afectan entre el 10 y el 40% de la población en los países industrializados. Las enfermedades alérgicas afectan profundamente la calidad de vida, y pueden dar lugar a complicaciones graves, incluso a la muerte, como puede ocurrir en los casos graves de asma y de anafilaxia. Las alergias son prevalentes, y son la causa principal de la pérdida de tiempo del trabajo y de la escuela y sus impactos en la vida personal así como también sus costos directos e indirectos para los sistemas médicos y la economía son enormes. Por ejemplo, la rinitis alérgica (fiebre del heno) afecta al 22% o más de la población de los Estados Unidos, mientras que el asma alérgica se cree que afecta al menos a 20 millones de residentes de los Estados Unidos. Se estimó que el impacto económico de las enfermedades alérgicas en los Estados Unidos, que incluye los costos de la atención de la salud y de la pérdida de productividad, ascendió a 6400 millones dólares solo en los años noventa.

25 La mayoría de las enfermedades alérgicas se originan por reacciones de hipersensibilidad mediadas por la inmunoglobulina E (IgE). La IgE es una clase de anticuerpo presente de manera normal en el suero en concentraciones mínimas. Se produce por células plasmáticas secretoras de IgE que expresan el anticuerpo en su superficie en una cierta etapa de su maduración. Los pacientes alérgicos producen niveles elevados de IgE con especificidad de unión para antígenos normalmente inoocuos a los que son sensibles. Estas moléculas de IgE circulan en la sangre y se unen a receptores específicos para IgE en la superficie de los basófilos en la circulación y de los mastocitos a lo largo del revestimiento de la mucosa y debajo de la piel. La unión del antígeno o el alérgeno a la IgE en los mastocitos, basófilos, y otros tipos de células, reticula las moléculas de IgE, y agrega los receptores subyacentes, provocando así que las células liberen mediadores vasoactivos y estimuladores neuronales tales como las histaminas, los leucotrienos, las prostaglandinas, la bradiquinina, y el factor activador de plaquetas. La rápida reacción del sistema inmune al antígeno causada por los complejos inmunes de anticuerpos conduce a la reacción de hipersensibilidad inmediata o mediada por anticuerpos, en contraste con las reacciones de hipersensibilidad retardada o mediada por células que involucran a las células T. Las reacciones inmunes mediadas por IgE se refieren específicamente como reacciones de hipersensibilidad tipo I.

40 El receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) es un mediador clave para las manifestaciones alérgicas inmediatas. Adicionalmente a los mastocitos y basófilos, los mediadores primarios de las reacciones alérgicas, el FcεRI se encuentra en un número de otros tipos de células que incluyen los eosinófilos, las plaquetas y en las células presentadoras de antígenos tales como los monocitos y las células dendríticas. Un receptor adicional para las IgE es el FcεRII, conocido además como CD23 o el receptor de baja afinidad para la Fc de la IgE. El FcεRII se expresa ampliamente en los linfocitos B, en los macrófagos, en las plaquetas, y en muchos otros tipos de células tales como las del músculo liso de las vías respiratorias. El FcεRII puede jugar un papel en la regulación por retroalimentación de la expresión de la IgE y subsecuentemente en la expresión del FcεRII en la superficie.

50 Dado que la IgE juega un papel central en la mediación de la mayoría de las reacciones alérgicas, la creación de tratamientos para controlar los niveles de IgE en el cuerpo y regular la síntesis de la IgE es de gran interés. Varias estrategias se proponen para el tratamiento de las enfermedades alérgicas mediadas por la IgE por la regulación negativa de los niveles de la IgE. Una estrategia involucra la neutralización de las moléculas de IgE mediante la unión de la cadena ε de la IgE en o cerca del sitio de unión del receptor de Fc. Por ejemplo, el Omalizumab (Xolair) es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-IgE que se une a la IgE en el mismo sitio Fc como el FcεRI. El Omalizumab provoca una reducción en la IgE total en el suero o circulante en pacientes atópicos, que atenúa la cantidad de la IgE específica para el antígeno que puede unirse a y sensibilizar a los mastocitos y basófilos tisulares. Esto, a su vez, conduce a una disminución en los síntomas de las enfermedades alérgicas. Interesantemente, los niveles de la IgE en suero aumentan después del inicio de la terapia a causa de la formación del complejos omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de suspender la terapia. Por consiguiente, este problema puede dar lugar a falsos negativos en las pruebas de diagnóstico y por lo tanto los niveles de IgE deben revisarse de manera rutinaria. En consecuencia, existe una necesidad de mejorar los métodos y las composiciones para reducir las enfermedades mediadas por la IgE y los síntomas de la enfermedad.

Wiggington y otros, Clin Exp Allergy. Feb 2008; 38(2):313-9. Epub 2007 Dec 7, describe una inmunoglobulina quimérica humana G1 anti-idiotipo reactiva para la inmunoglobulina E que inhibe la desgranulación de los basófilos a través de la reticulación del FcεpsilonRI con el FcγRIIb.

5

Chu y otros, Mol Immunol. Sep 2008;45(15): 3926-33. Epub 2008 Ag 8, describe la inhibición de la activación mediada por el receptor de células B de células B humanas primarias por el coacoplamiento del CD19 y del FcγRIIb con anticuerpos con la región Fc diseñada mediante ingeniería genética.

10

Resumen de modalidades ilustrativas

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a la membrana y en donde dicha región Fc es una región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con una región Fc parental y en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste de S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, S239D/S267E, y S239D/I332E, de acuerdo con el índice de la UE y en donde la región Fc parental es una IgG humana.

15

En un aspecto adicional, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención.

20

En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir el anticuerpo de la invención, que comprende cultivar la célula huésped de la invención y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

25

En un aspecto adicional, la invención proporciona un anticuerpo para su uso como un medicamento, dicho anticuerpo comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a la membrana y en donde dicha región Fc es una región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácidos en comparación con una región Fc parental y en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste de S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, y S239D/I332E, de acuerdo con el índice de la UE y en donde la región Fc parental es una IgG humana.

30

En la presente se describen novedosas moléculas de coacoplamiento que se unen a la IgE y al FcγRIIb con alta afinidad, composiciones que comprenden tales moléculas de coacoplamiento, y métodos de uso de dichas novedosas moléculas de coacoplamiento para tratar trastornos mediados por la IgE. Las moléculas de coacoplamiento descritas son capaces de inhibir a las células que expresan el FcγRIIb y la IgE de membrana, es decir células IgE+ FcγRIIb+. Las moléculas de coacoplamiento descritas son además preferentemente capaces de unirse a la IgE circulante. Los métodos inhibitorios descritos en la presente comprenden poner en contacto las células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento que coople la IgE y el FcγRIIb en la superficie de la célula.

35

Las composiciones descritas en la presente incluyen moléculas de coacoplamiento capaces del coacoplamiento de la IgE y el FcγRIIb con alta afinidad en la superficie de la célula. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a la IgE y al FcγRIIb con alta afinidad. Las moléculas de coacoplamiento descritas coacoplan preferentemente la IgE anclada a la membrana y el FcγRIIb en la superficie de una célula y preferentemente se unen al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una inmunoglobulina y de acuerdo con la invención, la inmunoglobulina es un anticuerpo, en donde la región Fv de dicho anticuerpo se une específicamente a la IgE. Adecuadamente dicho anticuerpo se une tanto a la IgE circulante como a la anclada a la membrana. De manera alternativa, adecuadamente dicho anticuerpo se une selectivamente a la IgE anclada a la membrana con relación a la IgE circulante. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico que tiene una primera región objetivo específica y una segunda región objetivo específica, en donde la primera región objetivo específica se une a la IgE y la segunda región objetivo específica se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente las primera y segunda regiones objetivo específicas son regiones Fv, en donde la primera región Fv se une a la IgE, y la segunda región Fv se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la pareja de fusión de la Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

40

45

50

55

Adecuadamente la molécula de coacoplamiento se une con el FcγRIIb, en donde la afinidad de dicha unión tiene una Kd de menos de aproximadamente 100 nM, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente 95 nM, menos de o igual a

aproximadamente 90 nM, menos de o igual a aproximadamente 85 nM, menos de o igual a aproximadamente 80 nM, menos de o igual a aproximadamente 75 nM, menos de o igual a aproximadamente 74 nM.

5 Adecuadamente la molécula de coacoplamiento que coacopla la IgE y el FcγRIIb con alta afinidad incluye una variante de inmunoglobulina con relación a una inmunoglobulina parental. Adecuadamente la variante de inmunoglobulina comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (por ejemplo, dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc parental, en donde dicha(s) modificación(es) están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, y 332, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. La(s) modificación(es) adecuada(s) está(n) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice de la UE. La(s) modificación(es) adecuada(s) está(n) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 235, 236, 266, 267, 268, 328, de acuerdo con el índice de la UE. La(s) modificación(es) adecuada(s) está(n) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 235, 236, 239, 266, 267, 268, y 328, de acuerdo con el índice de la UE. La(s) modificación(es) adecuada(s) está(n) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice de la UE.

20 Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234F, 234G, 234I, 234K, 234N, 234P, 234Q, 234S, 234V, 234W, 234Y, 234D, 234E, 235A, 235E, 235H, 235I, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 236A, 236E, 236N, 237A, 237E, 237H, 237K, 237L, 237P, 237Q, 237S, 237V, 237Y, 237D, 237N, 239D, 239E, 239N, 239Q, 265E, 266D, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298D, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327G, 327L, 327N, 327Q, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 329E, 330D, 330H, 330K, 330S, 331S, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234N, 234F, 234D, 234E, 234W, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327L, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 329E, 330D, 330H, 330K, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234E, 235Y, 235R, 236D, 236N, 237N, 266M, 267E, 268E, 268D, 327D, 327E, 328F, 328Y, 328W, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, y 328Y, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente dicha(s) modificación(es) es(son) al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 235Y, 236D, 266M, 267E, 268E, 268D, 328F, 328Y, y 328W, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE.

45 Adecuadamente dicha(s) modificación(es) resulta(n) en al menos una de las siguientes combinaciones o sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 239D/332E, 267E/268D, 267E/268E, y 267E/328F, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE.

50 Adecuadamente las modificaciones descritas en la presente reducen la afinidad a al menos un receptor con relación a la inmunoglobulina parental, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste de FcγRI, FcγRIIa, y FcγRIIIa. En este caso, las variantes de inmunoglobulina descritas en la presente pueden mediar reacciones de ADCC o ADCP reducidas con relación a la inmunoglobulina parental. Adecuadamente las modificaciones descritas en la presente aumentan la afinidad de al menos un receptor con relación a la inmunoglobulina parental, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste de FcγRI, FcγRIIa, and FcγRIIIa. Adecuadamente las inmunoglobulinas variantes descritas en la presente pueden mediar reacciones de ADCC o de ADCP aumentadas con relación a la inmunoglobulina parental.

55 La descripción describe además los métodos para la manipulación de las nuevas moléculas de coacoplamiento, que incluyen las composiciones de inmunoglobulinas.

La descripción describe además ácidos nucleicos aislados que codifican las moléculas de coacoplamiento, que incluyen las inmunoglobulinas descritas en la presente. La descripción describe además vectores que comprenden los ácidos nucleicos,

opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. La descripción describe además las células huésped que contienen los vectores, y los métodos para producir y recuperar opcionalmente las moléculas de coacoplamiento.

5 La descripción describe además las moléculas de coacoplamiento que comprenden las inmunoglobulinas descritas en la presente. Las moléculas de coacoplamiento pueden encontrar uso en un producto terapéutico. Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser anticuerpos.

10 La descripción describe además composiciones que comprenden las moléculas de coacoplamiento que se describen en la presente, y un vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

15 La descripción describe además métodos de inhibición de las células IgE+ FcγRIIb+. Los métodos de inhibición de las células descritas en la presente comprenden poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en donde dicha molécula de coacoplamiento se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente dicha molécula de coacoplamiento coacopla la IgE y el FcγRIIb en la superficie de la célula. Adecuadamente los métodos de inhibición comprenden poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se une a la IgE a través de su región Fv, y en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une al FcγRIIb con una Kd de 100 nM o menos. Adecuadamente, dicha región Fc se une al FcRIIIa y/o al FcγRIIIa con una afinidad que es mayor con relación a la IgG1 nativa. Adecuadamente los métodos comprenden poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en donde dicha molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une a la IgE, y dicha segunda región Fv se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Los métodos comprenden poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en donde dicha molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM.

25 La descripción describe además un método para reducir la secreción de IgE. El método incluye poner en contacto una células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en donde dicha molécula de coacoplamiento se une a la IgE y al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM.

30 La descripción describe además un método de inhibición de la maduración de las células B. Este método incluye poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en donde dicha molécula de coacoplamiento se une a la IgE y al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM.

35 La descripción describe además los usos terapéuticos y de diagnóstico para las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente. Adecuadamente las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se utilizan para tratar uno o más trastornos mediados por la IgE, por ejemplo, las enfermedades autoinmunes, las enfermedades inflamatorias, etc, mediadas por la inmunoglobulina IgE. Adecuadamente los trastornos alérgicos y atópicos que pueden tratarse por las composiciones descritas en la presente incluyen pero no se limitan al asma alérgica y atópica, la dermatitis atópica y el eczema, las rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica y la rinoconjuntivitis, la encefalomiелitis alérgica, la rinitis alérgica, la vasculitis alérgica, el choque anafiláctico, y las alergias para cualquier variedad de alergias ambientales o de alimentos. Los métodos de tratamiento descritos en la presente comprenden la administración a un paciente que necesita de tal administración de una cantidad terapéutica de una molécula de coacoplamiento que coacople la IgE y el FcγRIIb en la superficie de una célula.

45 Breve descripción de las figuras

50 Figura 1. Ilustración del novedoso enfoque mecanicista para la inhibición de las células B IgE+ FcγRIIb+ B. Bajo estímulos adecuados, las células B vírgenes pueden diferenciarse en células B IgE+. El acoplamiento del antígeno con el receptor de las células B IgE activa estas células, que después pueden diferenciarse en células plasmáticas que liberan la IgE circulante. La unión de la IgE circulante a los FcεR, por ejemplo, en los mastocitos, los basófilos y los eosinófilos, activa estas células. La liberación de histamina, prostaglandinas y otros mediadores químicos resulta en última instancia en los síntomas clínicos de la alergia y el asma. El Omalizumab, que tiene una región Fc de IgG1 nativa, es capaz de bloquear la unión de las IgE con los FcεR. Los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por el FcγRIIb, referidos como Anti-IgE-IIbE en la figura, son capaces no sólo del bloqueo de la unión de la IgE al FcεR, sino además de inhibir la activación de las células B IgE+ por el coacoplamiento mlgE FcγRIIb.

55 Figura 2. Sensogramas de la resonancia de plasmones superficiales por Biacore que muestran la unión de los anticuerpos anti-CD19 Fc variantes con los FcγRIIb humanos.

Figura 3. Afinidades de los anticuerpos de Fc variantes para los FcγRs humanos determinadas por Biacore. El gráfico muestra el log (K_A) para la unión de los anticuerpos IgG1 variantes y TS a los FcγRI (I), H131 FcγRIIa (H IIa), FcγRIIb (IIb), y V158 FcγRIIIa (V IIIa) humanos. La unión de G236D/S267E y S267E/L328F a V158 FcγRIIIa no fue detectable. La unión de G236R/L328R (Fc-KO) a todos los receptores probados no fue detectable.

Figura 4. Afinidades de anticuerpos de Fc variantes para FcγRs humanos determinadas por resonancia de plasmones superficiales por Biacore. La tabla proporciona las constantes de equilibrio K_D para la unión de los anticuerpos IgG1 variantes y TS a los FcγRI, H131 FcγRIIa FcγRIIb, y V158 FcγRIIIa humanos, y cuántas veces varía cada una con relación a la de la IgG1 nativa (TS). n.d. = no detectable.

Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) y las regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpos anti-IgE. Los límites de las regiones determinantes de complementariedad se definieron como se ha descrito anteriormente con base en una alineación estructural de las regiones variables de los anticuerpos (Lazar y otros, 2007, Mol Immunol 44:1986-1998).

Figura 6. Secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y ligera de las regiones constantes TS y variantes.

Figura 7. Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-IgE en toda su extensión que pueden usarse para seleccionar las células B+ IgE.

Figura 8. Tabla de datos de afinidad para la unión de los anticuerpos anti-IgE TS y variantes a la región Fc de la IgE y el FcγRIIb.

Figura 9. Gráfico de datos de afinidad para la unión de los anticuerpos anti-IgE variantes y TS a la región Fc de la IgE y al FcγRIIb.

Figura 10. ELISA de IgE que usa los anticuerpos anti-IgE comerciales (Mabtech) y locales (Omalizumab y MaE11) como reactivos de captura.

Figura 11. La región variable del anticuerpo anti-IgE omalizumab no compite con el anticuerpo de captura Mabtech para la detección de la IgE en el protocolo de ELISA.

Figura 12. La inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con anticuerpos anti-IgE variantes mejoró la afinidad con el FcγRIIb, pero no la unión de los anticuerpos que carecen de FcγR (Fc variante G236R/L328R) o que carecen de unión a la IgE (motavizumab). El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran.

Figura 13. Anticuerpos anti-IgE variantes no inhiben las células B IgG2+ con cambio de clase. El gráfico muestra la concentración de IgG2 liberada de las PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, con un α -CD40, y con concentraciones variables de los anticuerpos que se indican.

Figura 14. Inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con anticuerpos anti-IgE variantes mejorados respecto a la afinidad por el FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 15. La inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con anticuerpos variantes anti-IgE mejorados para la afinidad por el FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), con un anticuerpo de reticulación anti-CD79b BCR, y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 16. La inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con anticuerpos variantes anti-IgE mejorados para la afinidad por el FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), con un anticuerpo de reticulación anti- μ BCR, y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 17. La inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE mejoró la función efectora ADCC y ADCP. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), con un anticuerpo de reticulación anti-CD79b BCR, y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran.

Figura 18. La inhibición de las células B IgE+ con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE mejoró la función efectora ADCC y ADCP. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, con un anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), con un anticuerpo de reticulación anti- μ BCR, y con concentraciones variables de los anticuerpos que se muestran.

Figura 19. Protocolo para el estudio in vivo en huPBL-SCID para probar la actividad de los anticuerpos anti-IgE. Los días indicados reflejan el número de días después del injerto de las PBMCs de un donante positivo para los anticuerpos IgE específicos para Der p 1. Derp1 vacc. indica la vacunación con el antígeno Der p 1.

Figura 20. Niveles totales de IgG en suero del modelo in vivo huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23, y 37) reflejan la extracciones de sangre que se señalan en el protocolo en la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab_IgG1, y los 3 grupos H1L1 MaE11 indican grupos tratados con MaE11 humanizado que comprenden ya sea la IgG1 TS (IgG1), la variante S267E/L328F (IIbE), o la región Fc G236R/L328R (Fc-KO).

Figura 21. Niveles totales de IgE en suero del modelo in vivo huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23, y 37) reflejan la extracciones de sangre que se señalan en el protocolo en la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab_IgG1, y los 3 grupos H1L1 MaE11 indican grupos tratados con MaE11 humanizado que comprenden ya sea la IgG1 TS (IgG1), la variante S267E/L328F (IIbE), o la región Fc G236R/L328R (Fc-KO). El límite de cuantificación por el método de ELISA fue de 31,6 ng/ml; las muestras que estaban por debajo de este límite se informaron como 31,6 ng/ml en el gráfico.

Descripción detallada de las modalidades ilustrativas

En la presente se describen moléculas de coacoplamiento que imitan los efectos inhibitorios del coacoplamiento de la IgE anclada a la membrana con el Fc γ RIIb en las células B. Por ejemplo, se describen en la presente anticuerpos anti-IgE variantes diseñados mediante ingeniería genética de tal manera que el dominio Fc se une al Fc γ RIIb con hasta ~430 veces mayor afinidad. Con relación a la IgG1 nativa, las variantes mejoradas de unión con el Fc γ RIIb (IIbE) inhiben fuertemente la movilización de calcio inducida por BCR y la viabilidad en células humanas primarias B IgE+. El uso de una sola molécula, tal como un anticuerpo para suprimir las funciones de las células B por el coacoplamiento de una IgE BCR conocido y un Fc γ RIIb puede representar un enfoque novedoso en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE. Ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por la IgE incluyen respuestas alérgicas y el asma y se describen en más detalle más abajo.

Las moléculas de coacoplamiento de acuerdo con la descripción pueden tomar una variedad de configuraciones como se explica con más detalle más abajo. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a la IgE y al Fc γ RIIb con alta afinidad. En este caso la inmunoglobulina preferentemente coacopla la IgE anclada a la membrana y el Fc γ RIIb en la superficie de una célula y se une con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una molécula biespecífica que tiene una primera región objetivo específica y una segunda región objetivo específica, en donde la primera región objetivo específica se une a la IgE y la segunda región objetivo específica se une al Fc γ RIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM, aunque adecuadamente puede unirse al Fc γ RIIb con una Kd de menos de aproximadamente 10 nM o una Kd de menos de aproximadamente 1 nM y, en algunos casos puede unirse con una Kd de menos de 100 pM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico y las primeras y segundas regiones objetivo específicas son regiones Fv, en donde la primera región Fv se une a la IgE, y la segunda región Fv se une al Fc γ RIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une al Fc γ RIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. En este caso, la pareja de la fusión de Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

En la presente se describen varias definiciones. Tales definiciones están destinadas a abarcar equivalentes gramaticales.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" como se usa en la presente se entiende la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan Fc γ Rs reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y subsecuentemente causan la lisis de la célula objetivo.

Por "ADCP" o fagocitosis celular dependiente del anticuerpo como se usa en la presente se entiende a la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y subsecuentemente causan la fagocitosis de la célula objetivo.

5

Por "modificación de aminoácidos" en la presente se entiende una sustitución de aminoácido, una inserción y/o una delección en una secuencia de polipéptido. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en la presente se entiende la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S267E se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de la cadena pesada constante, en la que la serina en la posición 267 se sustituye con ácido glutámico. Por "inserción de aminoácido" o "inserción" como se usa en la presente se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental. Por "delección de aminoácido" o "delección" como se usa en la presente, se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental.

10

15

Por "anticuerpo" en la presente se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por la totalidad o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en los seres humanos, incluyen los loci genéticos kappa (κ), lambda (λ), y cadena pesada, que en conjunto comprenden los innumerables genes de la región variable, y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), IgE, IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. Los anticuerpos en la presente se entiende que incluyen los anticuerpos en toda su extensión y fragmentos de anticuerpos, y pueden referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo diseñado mediante ingeniería genética, o un anticuerpo generado por recombinación con propósitos experimentales, terapéuticos, u otros.

20

25

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos" como se usa en la presente se entiende uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquiera de los análogos no naturales que pueden estar presentes en una posición definida, específica.

30

Por "células CD32b+" o "célula FcγRIIb+" como se usa en la presente se entiende cualquier célula o tipo de célula que expresa CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b+ incluyen pero no se limitan a las células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos.

35

Por "célula IgE+" como se utiliza en la presente se entiende a cualquier célula o tipo de célula que exprese la IgE. En modalidades preferidas de la invención, las células IgE+ expresan la IgE anclada a la membrana. Las células IgE+ incluyen pero sin limitarse a las células B y las células plasmáticas.

40

Por "CDC" o "citotoxicidad dependiente de complemento" como se usa en la presente se entiende la reacción en donde uno o más componentes de las proteínas del complemento reconocen al anticuerpo unido en una célula objetivo y posteriormente causan la lisis de la célula objetivo.

45

Por "molécula de coacoplamiento" o equivalentes gramaticales se entiende una molécula bifuncional capaz de unirse a la IgE y al FcγRIIb en donde la Kd para la unión de la molécula al FcγRIIb en una superficie celular es de menos de aproximadamente 100 nM lo que resulta en la unión simultánea de la IgE y el FcγRIIb.

50

Por "región constante" de un anticuerpo como se define en la presente se entiende a la región del anticuerpo que está codificada por uno de los genes de la región constante de la cadena ligera o pesada de las inmunoglobulinas. Por "cadena ligera constante" o "región constante de la cadena ligera", como se usa en la presente, se entiende la región de un anticuerpo codificada por la cadena ligera kappa (Cκ) o lambda (Cλ). La cadena ligera constante comprende típicamente a un único dominio, y como se define en la presente se refiere a las posiciones de la 108 a la 214 de la Cκ o la Cλ, en donde la numeración es según el índice de la UE. Por "cadena pesada constante" o "región constante de la cadena pesada" como se usa en la presente se entiende a la región de un anticuerpo codificado por los genes mu, delta, gamma, alfa, o épsilon para definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA o IgE, respectivamente. Para los anticuerpos en toda su extensión, la cadena pesada constante, como se define en la presente, se refiere a la región desde el extremo N-terminal del dominio CH1 hasta el extremo C-terminal del dominio CH3, lo que comprende así las posiciones de la 118 a la 447, en donde la numeración es según el índice de la UE.

55

Por "función efectora" como se usa en la presente se entiende el evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen las funciones efectoras mediadas por el FcγR tales como la ADCC y la ADCP, y las funciones efectoras mediadas por el complemento tales como la CDC.

5 Por "célula efectora" como se usa en la presente se entiende una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores del complemento y/o de Fc y que media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero sin limitarse a los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas, los eosinófilos, los mastocitos, las plaquetas, las células B, los linfocitos grandes granulares, las células de Langerhans, las células asesinas naturales (NK), las células T $\gamma\delta$, y pueden ser de cualquier organismo que incluye, pero sin limitarse a los seres humanos, los ratones, las ratas, los conejos y los monos.

10 Por "Fab" o "región Fab" como se usa en la presente se entiende a los polipéptidos que comprenden los dominios inmunoglobulínicos V_H CH1, V_H , y C_L . Los Fab pueden referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo en toda su extensión o de un fragmento de anticuerpo.

15 Por "Fc" o "región Fc", como se usa en la presente se entiende al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio inmunoglobulínico de la región constante y en algunos casos, a una parte de la bisagra. Así Fc se refiere a los dos últimos dominios inmunoglobulínicos de la región constante de la IgA, la IgD, y la IgG, y a los tres últimos dominios inmunoglobulínicos de la región constante de la IgE y la IgM, y a la bisagra flexible que se encuentra hacia la zona N-terminal de estos dominios. Para la IgA y la IgM, la Fc puede incluir la cadena J. Para la IgG, la Fc comprende los dominios inmunoglobulínicos Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente para que comprenda los residuos C226 o P230 hacia su carboxilo-terminal, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. La Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe más abajo.

25 Por "polipéptido Fc" como se usa en la presente se entiende a un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fcs aislados, y fragmentos de Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser polipéptidos Fc.

30 Por "fusión de Fc" como se usa en la presente se entiende una proteína en donde uno o más polipéptidos está (n) unido(s) operativamente a la Fc. La fusión de Fc se entiende en la presente como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina receptora" (a veces con guiones) tal como se usa en la técnica anterior Chamow y otros, 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión de Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con una pareja de fusión, que generalmente puede ser cualquier proteína, polipéptido o una molécula pequeña. La función de la parte no-Fc de una fusión de Fc, es decir, la pareja de fusión, es mediar la unión del objetivo, y así es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede estar unida a la Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas proteicas de fusión pueden incluir, pero sin limitarse a, la región de unión al objetivo de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimocina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a un objetivo terapéutico. Tales objetivos pueden ser cualquier molécula, por ejemplo, un receptor extracelular que esté implicado en la enfermedad.

40 Por "receptor gamma Fc" o "Fc γ R" como se usa en la presente se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de los anticuerpos IgG y que están codificados sustancialmente por los genes Fc γ R. En los seres humanos esta familia incluye, pero sin limitarse a los Fc γ RI (CD64), que incluyen las isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, y Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), que incluyen las isoformas Fc γ RIIIa (que incluyen los alotipos H131 y R131), Fc γ RIIb (que incluyen las Fc γ RIIb-1 y las Fc γ RIIb-2), y las Fc γ RIIc; y las Fc γ RIII (CD16), que incluyen las isoformas Fc γ RIIIa (que incluyen los alotipos V158 y F158) y las Fc γ RIIIb (que incluyen los alotipos Fc γ RIIIb-NA1 y Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como también cualquier Fc γ Rs humano o isoformas de Fc γ R o alotipos no descubiertos. Un Fc γ R puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitarse a los seres humanos, los ratones, las ratas, los conejos y los monos. Los Fc γ Rs de ratón incluyen, pero sin limitarse a los Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), y Fc γ RIII-2 (CD16-2), así como también a cualquier Fc γ Rs de ratón o isoformas de Fc γ R o alotipos no descubiertos.

55 Por "ligando de Fc" o "receptor de Fc" como se usa en la presente se entiende una molécula, por ejemplo, un polipéptido, de cualquier organismo que se una a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo ligando-Fc. Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitarse a los Fc γ Rs, FcRn, las C1q, la C3, la lectina de unión a manano, el receptor de manosa, la proteína A *estafilocócica*, la proteína *Gstreptocócica*, y los FcR virales. Los ligandos de Fc además incluyen los homólogos de receptores Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos al Fc γ Rs Davis y otros, 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas desconocidas que se unan al Fc.

Por "anticuerpo en toda su extensión" como se usa en la presente se entiende a la estructura que constituye la forma

5 biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría mamíferos, incluyendo a los seres humanos y los ratones, el anticuerpo en toda su extensión del isotipo IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas inmunoglobulínicas, cada par tiene una cadena ligera y una pesada, cada cadena ligera comprende los dominios inmunoglobulínicos VL y CL, y cada cadena pesada comprende los dominios inmunoglobulínicos VH, C γ 1, C γ 2, y C γ 3. En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y en llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en sólo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc.

10 Por "inmunoglobulina" en la presente se entiende a una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulinas. Las inmunoglobulinas incluyen pero sin limitarse a anticuerpos (que incluyen anticuerpos biespecíficos) y fusiones de Fc. Las inmunoglobulinas pueden tener un número de formas estructurales, que incluyen pero sin limitarse a anticuerpos en toda su extensión, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales.

15 Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" como se usa en la presente se entiende una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta como se asegura por una persona con experiencia en la técnica de la estructura de las proteínas. Los dominios Ig típicamente tienen una topología característica de plegamiento β -sándwich. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo IgG de anticuerpos son VH C γ 1, C γ 2, C γ 3, VL, y CL.

20 Por "IgG" o "inmunoglobulina IgG" o "inmunoglobulina G" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma inmunoglobulínico reconocido. En los seres humanos esta clase comprende a las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

25 Por "IgE" o "inmunoglobulina IgE" o "inmunoglobulina E" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen épsilon inmunoglobulínico reconocido. La IgE puede estar anclada a la membrana (mIgE), o no anclada a la membrana, lo que se refiere en la presente como IgE circulante.

30 Por "inhibición" de las células o sus equivalentes gramaticales se entiende evitar o reducir la activación, la proliferación, la maduración o la diferenciación de las células objetivos.

35 Por "isotipo" como se usa en la presente, se entiende cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD, e IgE.

40 Por "modificación" en la presente se entiende a una alteración en las propiedades físicas, químicas o de secuencia de una proteína, polipéptido, anticuerpo, o inmunoglobulina. Las modificaciones descritas en la presente incluyen las modificaciones de aminoácidos y las modificaciones de glicofoma.

45 Por "modificación de glicofoma" o "glicofoma modificada" o "glicofoma diseñada mediante ingeniería genética" como se usa en la presente se entiende a una composición de carbohidratos que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo a un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidratos difiere químicamente de la de una proteína parental. La glicofoma modificada se refiere típicamente a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; así por ejemplo una variante de Fc puede comprender una glicofoma modificada. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la variante de Fc que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos.

50 Por "polipéptido parental", "proteína parental", "immunogloblin parental", "polipéptido precursor", "proteína precursora", o "inmunoglobulina precursora", como se usa en la presente se entiende un polipéptido no modificado, una proteína o una inmunoglobulina que se modifica subsecuentemente para generar una variante, por ejemplo, cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que sirva como un molde y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en la presente. El polipéptido parental puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o versión diseñada mediante ingeniería genética de un polipéptido de origen natural. El polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a las composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En consecuencia, por "polipéptido Fc parental" como se usa en la presente se entiende un polipéptido Fc que se modificó para generar un polipéptido Fc variante, y por "anticuerpo parental" como se usa en la presente se entiende a un anticuerpo que se modificó para generar un anticuerpo variante (por ejemplo, un anticuerpo parental puede incluir, pero sin limitarse a, una proteína que comprende la región constante de una Ig de origen natural).

55 Por "posición" como se usa en la presente se entiende un lugar en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden ser

numeradas secuencialmente, o de acuerdo a un formato establecido, por ejemplo, el índice de la UE tal como se describe en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo IgG1 humano.

5 Por "polipéptido" o "proteína" como se usa en la presente se entiende a al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye a las proteínas, los polipéptidos, los oligopéptidos y los péptidos.

10 Por "residuos" como se usa en la presente se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácidos asociada. Por ejemplo, la asparagina 297 (además referida como Asn297, además referida como N297) es un residuo en el anticuerpo IgG1 humano.

15 Por "antígeno objetivo" como se usa en la presente se entiende la molécula que está unida por la región variable de un anticuerpo dado, o la pareja de fusión de una fusión de Fc. Un antígeno objetivo puede ser una proteína, un carbohidrato, un lípido, u otro compuesto químico. Una fusión de Fc o de anticuerpo se dice que es "específica" para un antígeno objetivo dado sobre la base de que tiene afinidad por el antígeno objetivo.

Por "célula objetivo" como se usa en la presente se entiende una célula que expresa un antígeno objetivo.

20 Por "región variable" como se usa en la presente se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes $V\kappa$, $V\lambda$, y/o VH que componen los loci genéticos kappa, lambda, y de la cadena pesada inmunoglobulínica respectivamente.

25 Por "polipéptido variante", "variante de polipéptido", o "variante" como se usa en la presente se entiende una secuencia de polipéptido que difiere de la de una secuencia de polipéptido parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. El polipéptido parental puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (TS), o puede ser una versión modificada de un polipéptido TS. El polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí mismo, a una composición que comprende el polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En algunas modalidades, los polipéptidos variantes que se describen en la presente (por ejemplo, inmunoglobulinas variantes) pueden tener al menos una modificación de aminoácidos en comparación con el polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de ácido amino, etc en comparación con el parental. La secuencia de polipéptido variante en la presente puede poseer al menos aproximadamente un 80% de homología con una secuencia de un polipéptido parental, por ejemplo, de al menos aproximadamente un 90% de homología, un 95% de homología, etc. En consecuencia, por "variante de Fc" o "Fc variante" como se usa en la presente se entiende a una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Una variante de Fc sólo puede abarcar una región Fc, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, una fusión de Fc, una Fc aislada, un fragmento de Fc, u otro polipéptido que se codifique sustancialmente por la Fc. Una variante de Fc puede referirse al polipéptido Fc en sí mismo, a las composiciones que comprenden el polipéptido variante de Fc, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por "variante de polipéptido Fc" o "polipéptido de Fc variante" como se usa en la presente se entiende un polipéptido Fc que difiere de un polipéptido Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de la proteína" o "proteína variante" como se usa en la presente se entiende una proteína que difiere de una proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de IgG" o "IgG variante" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Por "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usa en la presente se entiende una secuencia inmunoglobulínica que difiere de la de una secuencia parental inmunoglobulínica en virtud de al menos una modificación de aminoácidos.

50 Por "tipo salvaje" o "TS" en la presente se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína TS, un polipéptido, un anticuerpo, una inmunoglobulina, una IgG, etc tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

Moléculas de coacoplamiento

55 Como se describe en la presente las moléculas de coacoplamiento son moléculas bifuncionales capaces de unirse al Fc γ R11b y a la IgE en la superficie de una célula. Estas moléculas pueden adoptar una variedad de configuraciones como se describe en más detalle en la presente. Preferentemente, las moléculas de coacoplamiento son proteínicas, aunque esto no se requiere necesariamente. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento puede ser una molécula bifuncional en la que la especificidad para el Fc γ R11b y/o la IgE es conferida por ejemplo por un ácido nucleico, polipéptido y/o molécula pequeña.

5 Preferentemente, la molécula de coacoplamiento se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento incluye a una inmunoglobulina que se une a la IgE y al FcγRIIb con alta afinidad. En este caso la inmunoglobulina de coacoplamiento coacopla preferentemente la IgE anclada a la membrana y el FcγRIIb en la superficie de una célula. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una molécula biespecífica que
 10 tiene una primera región objetivo específica y una segunda región objetivo específica, en donde la primera región objetivo específica se une a la IgE y la segunda región objetivo específica se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico y las primera y segundas regiones objetivo específicas son regiones Fv, en donde la primera región Fv se une a la IgE, y la segunda región Fv se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. En este caso, la pareja de fusión de Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

15 Adecuadamente la molécula de coacoplamiento es una molécula bifuncional en la que una primera región se une a la IgE y una segunda región se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Virtualmente cualquier proteína, molécula pequeña o ácido nucleico, por ejemplo, aptámeros, pueden estar unidos para generar la molécula de unión bifuncional y pueden incluir enlazadores como se describe en la presente. Adecuadamente las parejas proteicas de fusión pueden incluir, pero sin limitarse a, la región variable de un anticuerpo, la región de unión al objetivo de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimocina, o alguna otra proteína o dominio de proteína.
 20 Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente que dirija la molécula de coacoplamiento a un antígeno objetivo, tal como la IgE. Por ejemplo, Adecuadamente, la molécula de coacoplamiento puede comprender al FcεRI o al FcεRII/CD23 como pareja de fusión. Adecuadamente las inmunoglobulinas encuentran uso como moléculas de coacoplamiento.

25 Inmunoglobulinas

Tal como se describe en la presente, una inmunoglobulina es un componente preferido de una molécula de coacoplamiento y puede ser un anticuerpo una fusión de Fc una Fc aislada, un fragmento de Fc, o un polipéptido de Fc. De acuerdo con la invención, la inmunoglobulina es un anticuerpo. Como se describe en más detalle más abajo la inmunoglobulina encuentra un uso como una molécula bifuncional en la que la región Fv se une a la IgE y la región Fc se une al FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM. Adicionalmente, un anticuerpo encuentra uso en fusiones de Fc o en anticuerpos bifuncionales como se indica más abajo.

35 Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras apareadas. Las regiones variables de cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos, y son responsables de la unión al antígeno objetivo. Cada cadena se compone de dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales, y por lo tanto el término genérico inmunoglobulina se utiliza para tales proteínas.

40 Las unidades tradicionales estructurales de anticuerpos comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero se compone típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente entre 50 y 70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, que incluyen pero sin limitarse a la IgG1, la IgG2, la IgG3, y la IgG4. La IgM tiene subclases, que incluyen pero sin limitarse a, la IgM1 y la IgM2. La IgA tiene varias subclases, que incluyen pero sin limitarse a la IgA1 y la IgA2. Así, por "isotipo" como se usa en la presente se entiende cualquiera de las clases y subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e
 50 IgE.

Cada una de las cadenas ligera y pesada están compuestas de dos regiones distintas, referidas como las regiones variable y constante. La cadena pesada de la IgG se compone de cuatro dominios de inmunoglobulina unidos del N al C-terminal en el orden VH-CH1-CH2-CH3, en referencia al dominio variable de la cadena pesada, al dominio 1 de la cadena pesada constante, al dominio 2 de la cadena pesada constante, y al dominio 3 de la cadena pesada constante respectivamente (referidos además como VH-Cy1-Cy2-Cy3, en referencia al dominio de cadena variable, al dominio 1 constante gamma, al dominio 2 constante gamma y al dominio constante gamma 3, respectivamente). La cadena ligera de la IgG se compone de dos dominios de inmunoglobulina unidos del N-al C-terminal en el orden VL-CL, en referencia al dominio variable de cadena ligera y al dominio constante de la cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencia, y son responsables de la unión de un número de proteínas naturales para inducir

eventos bioquímicos importantes. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque puedan existir diferencias sutiles en la región variable.

5 La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión al antígeno de la molécula, y así determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno objetivo. La región variable se nombra así porque es la más distinta en la secuencia de otros anticuerpos de la misma clase. La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables primariamente del reconocimiento del antígeno. En la región variable, tres bucles se reúnen para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se refiere como una región determinante de complementariedad (de aquí en adelante referida como una "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es más significativa. Hay 6 CDR en total, tres por cada cadena pesada y ligera, designados VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3. La región variable fuera de las CDR se refiere como región marco (FR). Aunque no son tan diversos como los CDR, la variabilidad de la secuencia sí ocurre en la región FR entre diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un andamio estable (la región FR) sobre la que la diversidad de unión al antígeno sustancial (las CDR) pueden ser exploradas por el sistema inmune para obtener especificidad para un amplio conjunto de antígenos. Un número de estructuras de alta resolución están disponibles para una variedad de fragmentos de la región variable de diferentes organismos, algunos no unidos y algunos en complejos con el antígeno. Las características de secuencia y estructura de las regiones variables de los anticuerpos se describen, por ejemplo, en Morea y otros, 1997, *Blophys Chem* 68:9-16; Morea y otros, 2000, *Methods* 20:267-279, y las características conservadas de los anticuerpos se describen, por ejemplo, en Maynard y otros, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376.

10 La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante que es primariamente responsable de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulinas en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. En las modalidades descritas en la presente son de interés los dominios de las cadenas pesadas, que incluyen los dominios de la pesada constantes (CH) y la región bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, cada isotipo IgG tiene tres regiones CH. En consecuencia, los dominios "CH" en el contexto de las IgG son como sigue: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.

15 Otra región importante de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" ó "región bisagra de la inmunoglobulina" en la presente se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición UE 220 y el dominio IgG CH2 comienza en el residuo posición UE 237. Así en la presente se define la bisagra del anticuerpo IgG para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas modalidades, por ejemplo en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, con "bisagra inferior" que se refiere generalmente a las posiciones 226 o 230 a 236.

20 Las regiones Fc son de interés en las modalidades descritas en la presente. Por "Fc" o "región Fc", como se usa en la presente, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio inmunoglobulínico de la región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Así Fc se refiere a los dos últimos dominios inmunoglobulínicos de la región constante de IgA, IgD e IgG y los últimos tres dominios inmunoglobulínicos de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra N-terminal flexible de esos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios inmunoglobulínicos Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la región de la bisagra inferior entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente para incluir los residuos C226 o P230 a su carboxilo terminal, en donde la numeración está de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación. Por "polipéptido Fc" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que comprende todo o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc.

25 La región Fc de un anticuerpo interactúa con un número de receptores y ligandos de Fc, impartiendo un conjunto de capacidades funcionales importantes referidas como funciones efectoras. La región Fc para IgG, Fc comprende dominios Ig Cy2 y Cy3 y el N-terminal de la bisagra que conduce hacia Cy2. Una familia importante de receptores Fc para la clase IgG son los receptores gamma Fc (FcγRs). Estos receptores median la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmune (Raghavan y otros, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ravetch y otros, 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). En humanos esta familia de proteínas incluye FcγRI (CD64), que incluyen las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluyen las isoformas FcγRIIa (que incluyen los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluyen

FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluyen las isoformas FcγRIIIa (que incluyen los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluyen los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis y otros, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65,). Estos receptores típicamente tienen un dominio extracelular que media la unión a Fc, una región que se extiende en la membrana y un dominio intracelular que puede mediar algunos eventos de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T γγ. La formación del complejo Fc/FcγR recluta estas células efectoras a sitios de unión al antígeno, que resultan típicamente en eventos de señalización dentro de las células y respuestas inmunes subsecuentes importantes tales como la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La habilidad de mediar funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial por el cual los anticuerpos destruyen las células objetivo. La reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula objetivo y subsecuentemente causan la lisis de la célula objetivo se refiere como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) (Raghavan y otros, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie y otros, 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766; Ravetch y otros, 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). La reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido a una célula objetivo y subsecuentemente causan fagocitosis de la célula objetivo se refiere como fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por el FcγRs, IgG1 e IgG3 típicamente se unen sustancialmente mejor a los receptores que IgG2 e IgG4 (Jefferis y otros, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). El FcγRs une la región Fc de IgG con diferentes afinidades. Los dominios extracelulares de FcγRIIIa y FcγRIIIb son idénticos en un 96 %, sin embargo FcγRIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, por cuanto FcγRI, FcγRIIa/c y FcγRIIIa son reguladores positivos de la activación provocada por el complejo inmune, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación basado en el inmunoreceptor de tirosina (ITAM), FcγRIIb tiene un motivo de inhibición basado en el inmunoreceptor de tirosina (ITIM) y es por lo tanto inhibitorio. Así los primeros se refieren como receptores de activación y FcγRIIb se refiere como un receptor inhibitorio. A pesar de estas diferencias en afinidades y actividades, todos los FcγRs se unen a la misma región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cγ2 y la bisagra precedente. Esta interacción está estructuralmente bien caracterizada (Sondermann y otros, 2001, *J Mol Biol* 309:737-749), y varias estructuras de la unión del Fc humano al dominio extracelular del FcγRIIIb humano han sido aclaradas (pdb código de registro 1E4K) (Sondermann y otros, 2000, *Nature* 406:267-273) (pdb códigos de registro 1IIS y 1IIX) (Radaev y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477).

Un solapamiento pero en sitios separados en Fc sirve como interfase para la proteína del complemento C1q. En el mismo sentido que la unión Fc/FcγR media la ADCC, la unión Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cγ2 y Cγ3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión al cual recicla al anticuerpo endocitado desde el endosoma regresando a la corriente sanguínea (Raghavan y otros, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie y otros, 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766). Este proceso, acoplado con la exclusión de la filtración del riñón debido a la gran talla de la molécula en toda su extensión, resulta favorable a la duración del tiempo de vida media del anticuerpo en suero en el intervalo de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn juega también un papel clave en el transporte del anticuerpo. El sitio de unión para FcRn en Fc es además el sitio al cual se unen las proteínas bacterianas A y G. La fuerte unión por estas proteínas se explota típicamente como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de proteínas. La fidelidad de estas regiones, el complemento y las regiones de unión de FcRn/proteína A son importantes para las propiedades clínicas de los anticuerpos y su desarrollo.

Una característica clave de la región Fc es la glicosilación unida a N conservada que ocurre en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como se refiere algunas veces, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales por lo que los anticuerpos tienen que ser producidos mediante el uso de sistemas de expresión de mamíferos. La unión eficiente de Fc a FcγR y C1q requiere esta modificación, y alteraciones en la composición del carbohidrato en N297 o su eliminación afecta la unión a estas proteínas (Umana y otros, 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies y otros, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Mimura y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:45539-45547.; Radaev y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:16478-16483; Shields y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Shields y otros, 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Simmons y otros, 2002, *J Immunol Methods* 263:133-147).

Las inmunoglobulinas de las modalidades descritas en la presente pueden ser además una proteína similar a un anticuerpo referida como una fusión de Fc (Chamow y otros, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200). "Fusión de Fc" se entiende en la presente como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig" y "globulina receptora" (a veces con guiones) tal como se usa en la técnica anterior (Chamow y otros, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200). Una fusión Fc es una proteína

5 en donde uno o más polipéptidos, en la presente referida como "pareja de fusión", está unida operativamente a Fc. Una fusión Fc combina la región Fc de un anticuerpo y de este modo es favorable a funciones efectoras y farmacocinéticas, con la región de unión al objetivo de un receptor, ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. El papel del último es mediar el reconocimiento del objetivo y de este modo es análogo funcionalmente a la región variable del anticuerpo. Debido al solapamiento estructural y funcional de las fusiones de Fc con los anticuerpos, la discusión sobre anticuerpos en la presente descripción se extiende además a las fusiones Fc.

10 Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas proteicas de fusión pueden incluir, pero sin limitarse a, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión al objetivo de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimocina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente que dirija la fusión de Fc a un antígeno objetivo. Tal antígeno objetivo puede ser cualquier molécula, por ejemplo un receptor extracelular que está implicado en una enfermedad. Las fusiones de Fc de las modalidades descritas en la presente tienen preferentemente especificidad para IgE. Por ejemplo, en las modalidades preferidas, las fusiones de Fc de la invención pueden comprender Fc ϵ R1 o Fc ϵ R2/CD23 como una pareja de fusión. Las fusiones de Fc de la invención preferentemente comprenden una o más variantes en la región Fc que mejoran la afinidad por Fc γ R1b.

20 Las parejas de fusión pueden estar unidas a cualquier región de una región Fc, que incluye a los extremos N o C terminales o a algún residuo entre los términos. En una modalidad, una pareja de fusión está unida al N o C terminal de la región Fc. Una variedad de enlazadores puede usarse en algunas modalidades descritas en la presente para unir covalentemente regiones Fc a una pareja de fusión. En la presente se entiende por "enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de inmovilización" o equivalentes gramaticales de estos, una molécula o grupo de moléculas (tal como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para poner las dos moléculas en una configuración. En la técnica los enlazadores son conocidos; por ejemplo, enlazadores homo o hetero-bifuncionales como son bien conocidos (ver, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticulación, páginas 155-200). Pueden usarse un número de estrategias para unir covalentemente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero sin limitarse a uniones de polipéptidos entre los extremos N y C terminales de proteínas o dominios de proteínas, uniones a través de enlaces disulfuros y uniones a través de reactivos químicos de reticulación. En un aspecto de esta modalidad el enlazador es un enlace peptídico, generado por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido enlazador puede predominantemente incluir los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que se adecúe a unir dos moléculas en tal forma que ellas asuman la conformación correcta relativa una a la otra de manera que mantengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. En una modalidad, el enlazador es de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una modalidad, pueden usarse enlazadores h de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (que se exponen como sec. con núm. de ident:1), (GGGS)_n (que se exponen como sec. con núm. de ident:2), y (GGGS)_n (que se exponen como sec. con núm. de ident:3), donde n es un entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como serán apreciados por los expertos en la técnica. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos que incluyen, pero sin limitarse a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden usarse como enlazadores, esto es pueden usarse para unir regiones Fc a una pareja de fusión.

45 Además los polipéptidos Fc se contemplan como parejas de fusión. Así una inmunoglobulina como se describe en la presente puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende una o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para receptores Fc con una molécula de proteína única. En una modalidad, las regiones Fc pueden unirse mediante el uso del enfoque de la ingeniería química. Por ejemplo, los Fab's y Fc's pueden unirse por enlaces tioéter que se originan en los residuos de cisteína en las bisagras, que generan moléculas tales como FabFc₂. Las regiones Fc pueden unirse mediante el uso de manipulación de disulfuros y/o reticulación química. En una modalidad, las regiones Fc pueden unirse genéticamente. En una modalidad, las regiones Fc en una inmunoglobulina se unen genéticamente para generar regiones Fc unidas colocadas una detrás de la otra como está descrito en USSN 11/022,289 (US 2005 - 0249723 A1), presentada 12/21/2004, titulada "Fc polypeptides with novel Fc ligand binding sites.". Los polipéptidos Fc unidos colocados uno detrás del otro pueden comprender una o más regiones Fc, por ejemplo de una a tres regiones Fc, dos regiones Fc. Quizás sea ventajoso explorar un número de construcciones manipuladas con el fin de obtener regiones Fc homo- o hetero- unidas una detrás de la otra con las propiedades estructurales y funcionales más favorables. Las regiones Fc unidas una detrás de la otra pueden ser regiones Fc homo unidas una detrás de la otra, eso es una región Fc de un isotipo que es genéticamente fusionada a otra región Fc del mismo isotipo. Se anticipa que porque hay múltiples Fc γ R, C1q y/o sitios de unión FcRn sobre polipéptidos Fc unidos uno detrás del otro, las funciones efectoras y/o farmacocinéticas pueden mejorarse. En una modalidad alternativa, las regiones Fc de isotipos diferentes, pueden unirse una detrás de la otra, referidas como regiones Fc hetero unidas una detrás de la otra. Por ejemplo, debido a la capacidad de los

receptores FcγR y FcαR para unirse al objetivo, una inmunoglobulina que une FcγRs y FcαRI puede proporcionar una ventaja clínica significativa.

Las inmunoglobulinas de las modalidades descritas en la presente pueden codificarse sustancialmente por genes de inmunoglobulinas pertenecientes a cualquiera de las clases de anticuerpos. Las inmunoglobulinas descritas en la presente, en ciertas modalidades, pueden usarse en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias pertenecientes a la clase IgG de anticuerpos, que incluyen IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. La figura 1 proporciona una alineación de estas secuencias de IgG humana. En modalidades alternas, las inmunoglobulinas descritas en la presente, pueden usarse en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a la IgA (que incluyen las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG, o IgM. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender más de una cadena de proteína, por ejemplo, puede ser un anticuerpo o fusión de Fc que es un monómero o un oligómero, que incluye un homo- o hetero-oligómero.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden codificarse sustancialmente por genes de cualquier organismo, por ejemplo, mamíferos (que incluyen pero sin limitarse a humanos, roedores (que incluyen pero sin limitarse a ratones y ratas), lagomorfos (que incluyen pero sin limitarse a conejos y liebres), camelidae (que incluyen pero sin limitarse a camellos, llamas, y dromedarios) y primates no humanos, que incluyen pero sin limitarse a Prosimians, Platyrrhini (monos Nuevo Mundo), Cercopithecoidea (monos Viejo Mundo), y Hominoidea que incluyen los Gibones y Simios Menores y Grandes. Las inmunoglobulinas descritas en la presente en ciertas modalidades, pueden ser humanas sustancialmente.

Como es bien conocido en la técnica, en la población humana existen polimorfismos de inmunoglobulinas. El polimorfismo Gm está determinado por los genes IGHG1, IGHG2 y IGHG3 que tienen alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos referidos a G1m, G2m, y G3m como marcadores de alotipos de las moléculas humanas IgG1, IgG2 e IgG3 (no han sido encontrados alotipos Gm en la cadena 4 gamma). Los marcadores pueden ser clasificados en "alotipos" e "isoalotipos". Estos se distinguen sobre bases serológicas diferentes dependientes de las fuertes homologías de secuencia entre isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicos especificados por las formas alélicas de los genes de Ig. Los alotipos representan ligeras diferencias en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de individuos diferentes. Aún una diferencia de un único aminoácido puede dar lugar a un determinante alotípico, aunque en muchos casos estos son varias sustituciones de aminoácidos que han ocurrido. Los alotipos son diferencias de secuencia entre alelos de una subclase por lo cual los antisueros reconocen sólo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que está compartido con la región homóloga no polimórfica de uno o más de otros isotipos y debido a esto el antisuero reaccionará con los alotipos relevantes y los isotipos homólogos relevantes. (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem Immunol. 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, Semin Immunol 2(6):457-66).

Las formas alélicas de las inmunoglobulinas humanas han sido bien caracterizadas (Revisión de la OMS de la significación para los marcadores alotípicos y relacionados de inmunoglobulinas humanas. J Immunogen 1976, 3: 357-362; Revisión de la OMS de la significación para los marcadores alotípicos y relacionados de inmunoglobulinas humanas. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Además se han caracterizado otros polimorfismos. (Kim y otros, 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9). Hasta el presente, se conocen 18 alotipos Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc y otros, The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, págs. 43-78 (1990); Lefranc, G. y otros, 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se heredan en combinaciones estables son llamados haplotipos Gm. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden codificarse sustancialmente por cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden componer un polipéptido Fc, que incluye pero sin limitarse a anticuerpos, Fcs aislados, Fragmentos de Fc y fusiones de Fc. En una modalidad, una inmunoglobulina descrita en la presente es un anticuerpo en toda su extensión, que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye las regiones variables y constantes. Para el anticuerpo isotipo IgG en toda su extensión es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprende los dominios VL y CL de la inmunoglobulina y cada cadena pesada comprende los dominios VH, Cγ1, Cγ2, y Cγ3 de la inmunoglobulina. En otra modalidad, las inmunoglobulinas descritas en la presente son regiones Fc aisladas o fragmentos Fc.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ser una variedad de estructuras, que incluyen pero sin limitarse a fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, dominios de anticuerpos, anticuerpos sintéticos (referidos a veces en la presente como "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpo (referidos a veces como "conjugados de anticuerpo"), y los fragmentos de cada uno respectivamente.

En una modalidad, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos específicos de anticuerpo incluyen, pero sin limitarse a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (II) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo único; (iv) el fragmento dAb, el cual consiste en una variable única, (v) regiones CDR aisladas, (vi) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena única (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un péptido enlazador el cual permite asociar los dos dominios para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) los dímeros Fv biespecíficos de cadena única y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión de genes. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. En Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 están descritos ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos y en las referencias citadas en ellos.

En una modalidad, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo multiespecífico y notablemente un anticuerpo biespecífico también a veces referido como "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden fabricarse en una variedad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, prepararse químicamente o a partir de híbridos. En una modalidad, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son anticuerpos similares a proteínas minimizados que comprenden una Fvsc unida a un dominio CH3. En algunos casos, la Fvsc puede estar unida a la región Fc y puede incluir alguna o toda la región de la bisagra. Para una descripción de anticuerpos multi específicos ver Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 y las referencias citadas en él.

Anticuerpos No humanos, Quiméricos, Humanizados y Completamente humanos

La región variable de un anticuerpo, como es bien conocida en la técnica, puede componerse de secuencias de una variedad de especies. En algunas modalidades, la región variable del anticuerpo puede ser de una fuente no humana, que incluye pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, camellos, llamas y monos. En algunas modalidades, los componentes del andamio pueden ser una mezcla a partir de especies diferentes. Como tal, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. Generalmente, ambos "anticuerpos quiméricos" y "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones a partir de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden región(es) variable(s) a partir de un ratón u otra especie no humana y la(s) región(es) constante(s) a partir de un humano.

Los "anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos que tienen las regiones marco de dominio variable cambiadas por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto los CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de sus CDRs. Algunos o todos los CDR que están codificados por ácidos nucleicos que se origina en un organismo no humano, son injertados dentro del marco de hoja beta de una región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo, la especificidad del cual está determinada por los CDR injertados. La creación de tales anticuerpos se describe en, por ejemplo, WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen y otros, 1988, Science 239:1534-1536. La "mutación reversible" de los residuos marco del aceptor seleccionado para los residuos donantes correspondientes se requiere frecuentemente para recobrar la afinidad que se pierde en la construcción inicial insertada (Patente de los EE.UU. núm. 5,693,762). El anticuerpo humanizado óptimamente además comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana y así típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados pueden además generarse mediante el uso de ratones con un sistema inmune diseñado mediante ingeniería genética. Roque y otros, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. En la técnica es bien conocida una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos. (Vea Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (Estados Unidos), y referencias citadas en él). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de los anticuerpos no humanos puede incluir métodos de pulimiento, como por ejemplo, es descrito en Roguska y otros, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91:969-973. En una modalidad, se ha madurado la afinidad del anticuerpo parental, como es conocido en la técnica. Los métodos basados en la estructura pueden emplearse para la humanización y la maduración de la afinidad, como por ejemplo se describe en Estados Unidos Ser. núm. 111044,590 (Estados Unidos 2006-0008883 A1). Los métodos basados en selección pueden emplearse para humanizar y/o madurar la afinidad de la región variable del anticuerpo, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno objetivo. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto de sólo partes de los CRD, que incluyen pero sin limitarse a métodos descritos en USSN 09/810,50 (Estados Unidos 2002-0034765 A1). Tan y otros, 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalls y otros, 2002, J. Immunol. 169:3076-3084. Los métodos basados en estructura pueden emplearse para la humanización y la maduración de la afinidad, como por ejemplo se describe en USSN 101153,159

(Estados Unidos 2002-0177170 A1) y aplicaciones relacionadas. En ciertas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce mediante el uso de un método descrito en Lazar y otros, 2007, Mol Immunol 44:1986-1998 y USSN 11/004.590 (Estados Unidos 2006-0008883 A1); titulado "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", presentado el 3 de Diciembre, 2004.

5

En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano con al menos una modificación como se señala en la presente. El "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo completo humano" se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia del gen de un anticuerpo derivado a partir de un cromosoma humano con las modificaciones señaladas en la presente. Los anticuerpos completamente humanos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante el uso de ratones transgénicos (Bruggemann y otros, 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458) o librerías de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección (Griffiths y otros, 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108). En una modalidad los anticuerpos equivalentes a humanos pueden generarse por computación como se señala en PCT/US09/41144, (documento WO 2009/129538 A2).

10

15

Anticuerpos anti-IgE

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se unen a IgE. Los anticuerpos anti-IgE de la invención pueden comprender cualquier región variable, conocida o no conocida aún, que tenga especificidad para IgE. Los anticuerpos anti-IgE conocidos incluyen pero sin limitarse a anticuerpos murinos MaE11, MaE13 y MaE15, humanizados y/o versiones diseñadas mediante ingeniería genética de estos anticuerpos que incluyen E25, E26 y E27, particularmente E25, además conocido como rhuMab-E25, además conocido como Omalizumab, tales como aquellos descritos en Estados Unidos 761889, Estados Unidos 6329509, Estados Unidos US20080003218A1, y Presta, LG y otros, 1993, J Immunol 159:2623-2632. Una versión diseñada mediante ingeniería genética preferida de MaE11 es H1L1 MaE11, descrita en los Ejemplos en la presente. Otros anti-IgE que pueden ser útiles para la invención incluyen anticuerpo murino TES-C21, TES-C21 quimérico, además conocido como CGP51901 (Come, J y otros, 1997, J Clin Invest 99:879-887; Racine-Poon, A y otros, 1997, Clin Pharmacol Ther 62:675-690), y versiones humanizadas y/o diseñadas mediante ingeniería genética de este anticuerpo que incluye pero sin limitarse a CGP56901, además conocido como TNX-901, tales como aquellos anticuerpos descritos en Kolbinger, F y otros, 1993, Protein Eng 6:971-980. Otros anticuerpos anti-IgE que pueden usarse para la invención se describen en estados Unidos 6066718, Estados Unidos 6072035, PCT/US04/02894, (Documento WO 2004/070011 A1) Estados Unidos 5342924, Estados Unidos 5091313, Estados Unidos 5449760, Estados Unidos 5543144, Estados Unidos 5342924, y Estados Unidos 5614611. Otros anticuerpos anti-IgE útiles incluyen el anticuerpo murino BSW17. La secuencia de aminoácidos de los dominios VH y VL de la región variable y CDR de algunos de estos anticuerpos se proporcionan en la Figura 5.

20

25

30

35

Variantes de Fc y propiedades de unión del receptor Fc

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una variante de Fc. Una variante de Fc comprende una o más de una modificación de aminoácidos con relación a un polipéptido Fc parental, en donde las modificaciones de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Una variante de Fc descrita en la presente difiere en la secuencia de aminoácidos de su parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Así las variantes de Fc descritas en la presente tienen al menos una modificación de aminoácidos comparadas al parental. Alternativamente las variantes de Fc descritas en la presente pueden tener más de una modificación de aminoácido comparadas al parental, por ejemplo de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, por ejemplo de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc. comparada al parental. Así las secuencias de las variantes de Fc y aquellas del polipéptido Fc parental son homólogas sustancialmente. Por ejemplo, las secuencias variantes de Fc variante en la presente poseerá aproximadamente el 80% de homología con la secuencia de la variante de Fc parental, por ejemplo al menos aproximadamente el 90% de homología, al menos aproximadamente el 95% de homología, al menos aproximadamente el 98% de homología, al menos aproximadamente el 99% de homología, etc. las modificaciones descritas en la presente incluyen modificaciones de aminoácidos, que incluyen inserciones, deleciones y sustituciones. Las modificaciones descritas en la presente además incluyen modificaciones de las glicofomas. Las modificaciones pueden hacerse genéticamente mediante el uso de biología molecular, o pueden hacerse enzimáticamente o químicamente.

40

45

50

55

Las variantes de Fc descritas en la presente se definen de acuerdo con las modificaciones de los aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, S267E es una variante de Fc con la sustitución S267E relacionada al polipéptido parental Fc. Igualmente, S267E/L328F define una variante de Fc con las sustituciones S267E y L328F relacionadas al polipéptido parental Fc. La identidad de los aminoácidos WT puede ser inespecífica, en tal caso la variante mencionada se refiere como 267E/328F. Se señala que el orden en el cual las sustituciones se proporcionan es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 267E/328F es la misma variante de Fc que 328F/267E, y así sucesivamente. A menos que se señale de cualquier otra

manera, las posiciones discutidas en la presente son numeradas de acuerdo con el índice de la UE o esquema de numeración de la UE (Kabat y otros, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta Ed., Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Salud, Bethesda). El índice de la EU o índice EU como en Kabat o esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo de EU (Edelman y otros, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85).

En ciertas modalidades, las variantes de Fc descritas en la presente se basan en secuencias de IgG humana y así las secuencias de IgG humana se usan como las secuencias "base" contra las cuales se comparan otras secuencias, que incluyen pero sin limitarse a secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedores y primates. Las inmunoglobulinas pueden además comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgGD, IgGM, y similares. Se contempla que, aunque las variantes de Fc descritas en la presente se diseñan mediante ingeniería genética en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden diseñarse en o "transferirse" al contexto de otra, segunda IgG parental. Esto se hace determinando los residuos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda IgG, típicamente basadas en secuencias u homología estructural entre las secuencias de las primeras y segundas IgGs. Con el fin de establecer homología, la secuencia de aminoácido de una primera IgG señalada en la presente se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias mediante el uso de uno o más de los programas conocidos en la técnica de alineación de homología (por ejemplo mediante el uso de residuos conservados entre especies), que permiten inserciones necesarias y deleciones con el fin de mantener la alineación (por ejemplo evitando la eliminación de residuos conservados mediante deleciones e inserciones arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a un aminoácido particular en la secuencia primaria de la primera inmunoglobulina. La alineación de los residuos conservados pueden conservar el 100% de tales residuos Sin embargo, a las alineaciones de residuos conservados mayores que el 75% o tan pequeñas como el 50% son además adecuadas definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes pueden además definirse mediante la determinación de la homología estructural entre una primera y segunda IgG que es a nivel de estructura terciaria para las IgG cuyas estructuras han sido determinadas. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular del parental o precursor (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de aproximadamente 0.13 nm, después de la alineación. En otra modalidad, los residuos equivalentes están dentro de aproximadamente 0.1 después de la alineación. La alineación se logra después que se ha orientado el mejor modelo y posicionado para dar el máximo solapamiento de las coordenadas atómicas de átomos de proteínas sin hidrógeno. Independientemente a cómo los residuos equivalentes o correspondientes se determinan e independientemente a la identidad del IgG parental en el cual las IgG se elaboran que se entiende que están convoyadas, es que las variantes de Fc descubiertas como se describe en la presente pueden diseñarse mediante ingeniería genética en cualquier segundo IgG parental que tiene una secuencia significativa u homología estructural con la variante de Fc. Así por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en donde el anticuerpo parental es IgG1 humana, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente u otros métodos para la determinación de residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede diseñarse en otro anticuerpo IgG1 parental que une un antígeno diferente, un anticuerpo IgG2 humano parental, un anticuerpo IgA humano parental, una IgG2a de ratón o un anticuerpo IgG2b parental y similares. De nuevo, como está descrito anteriormente, el contexto de la variante de Fc parental no afecta la habilidad para transferir las variantes de Fc descritas en la presente a otros IgG parentales.

Las variantes de Fc descritas en la presente pueden optimizarse para una variedad de propiedades de unión del receptor Fc. Una variante de Fc que se diseña mediante ingeniería genética o se predice para presentar una o más propiedades optimizadas se refiere en la presente como una "variante de Fc optimizada". Las propiedades que pueden optimizarse incluyen pero sin limitarse a mejorar o reducir la afinidad por un FcγR. En una modalidad, las variantes de Fc descritas en la presente están optimizadas para poseer una afinidad mejorada para un receptor inhibitorio FcγRIIb. En otras modalidades, las inmunoglobulinas descritas en la presente proporcionan una afinidad mejorada para Fc γRIIb, aún afinidad reducida para uno o más FcγRs activadores, que incluyen por ejemplo FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR pueden expresarse en células a partir de cualquier organismo, que incluyen pero sin limitarse a humanas, monos cinomolgus y ratones. Las variantes de Fc descritas en la presente pueden optimizarse para poseer una afinidad mejorada para el FcγRIIb humano.

Por "mayor afinidad" o "afinidad aumentada" o "afinidad mejorada" o "mejor afinidad" que un polipéptido parental de Fc como se usa en la presente se entiende que una variante de Fc une a un receptor Fc con una constante de asociación de equilibrio significativamente más alta (K_A o K_a) o más baja constante de disociación de equilibrio (K_D o K_d) que el polipéptido parental de Fc cuando las cantidades de la variante y el polipéptido parental en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante Fc con la afinidad por la unión al receptor de Fc aumentada puede presentar un aumento desde aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 1000 veces, por ejemplo desde aproximadamente 10 veces hasta aproximadamente 500 veces en la afinidad del receptor Fc por la unión comparada con el polipéptido Fc parental, donde la afinidad por la unión del receptor Fc es determinada, por ejemplo mediante los métodos de unión descritos en la presente,

que incluyen, pero sin limitarse a Biacore por el experto en la técnica. En consecuencia, por "afinidad reducida" en comparación con un polipéptido Fc parental como se usa en la presente se entiende que una variante de Fc se une a un receptor de Fc con una significativamente más baja K_A o más alta K_D que el polipéptido Fc parental. La afinidad mayor o reducida puede además definirse con relación a un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, de acuerdo con los datos en la presente, la IgG1 tipo salvaje (nativa) se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 2 μM, o aproximadamente 2000 nM. Además, algunas variantes de Fc descritas en la presente se unen a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 10 veces mayor que la IgG1 tipo salvaje. Como se descubrió en la presente, afinidad mayor o mejorada significa que tiene una K_D más baja que aproximadamente 100 nM, por ejemplo entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM, o menos que aproximadamente 1 nM.

Los anticuerpos anti-IgE de la invención tienen preferiblemente alta afinidad por FcγRIIb. Por alta afinidad en la presente se entiende que la afinidad de la interacción entre los anticuerpos y el FcγRIIb es más fuerte que 100 nM. Esto es decir que la constante de disociación del equilibrio K_d para la unión del anticuerpo a FcγRIIb es más baja que 100 nM.

En una modalidad, las variantes de Fc proporcionan una afinidad a FcγRIIb mejorada selectivamente con relación a uno o más receptores activadores. Una afinidad selectivamente mejorada significa que la variante de Fc tiene una afinidad aumentada para FcγRIIb con relación a los receptores que se activan comparados con el polipéptido Fc parental pero que tiene reducida afinidad para los receptores que se activan comparada con el polipéptido Fc parental, o significa que la variante de Fc tiene una afinidad aumentada para ambos FcγRIIb y los receptores activadores comparados con el polipéptido Fc parental, sin embargo el aumento en afinidad es mayor para FcγRIIb que para los receptores activadores. En modalidades alternas, las variantes de Fc reducen o remueve la unión a uno o más FcγRs que se activan, reduce o remueve la unión a una o más proteínas de complemento, reduce o remueve una o más funciones efectoras mediadas por FcγR y/o reduce o remueve una o más funciones efectoras mediadas por el complemento.

La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγRs proporciona aún otro parámetro que impacta la utilidad terapéutica de las variantes de Fc descritas en la presente. Considerando que la especificidad y selectividad de una variante dada de Fc para las diferentes clases de FcγRs afecta significativamente la capacidad de una variante de Fc de direccionar un antígeno dado para el tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o selectividad de una variante de Fc para diferentes formas polimórficas de estos receptores puede en parte determinar cuál investigación o experimentos preclínicos pueden ser adecuados para examinar y finalmente cuál población de pacientes puede o no responder al tratamiento. Así la especificidad o selectividad de las variantes de Fc descritas en la presente para los polimorfismos del receptor Fc, que incluyen, pero sin limitarse a FcγRIIIa, FcγRIIIa, y los similares, puede usarse para guiar la selección de una investigación válida y experimentos preclínicos, diseño de ensayos clínicos, selección de pacientes, dependencia de dosificación y/u otros aspectos concernientes a los ensayos clínicos.

Las variantes de Fc descritas en la presente pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con receptores Fc distintos de FcγRs, que incluyen pero sin limitarse a proteínas del complemento FcRn, y receptores (FcRHs) homólogos al receptor Fc. Los FcRH incluyen pero sin limitarse a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, y FcRH6 (Davis y otros, 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante dada de Fc para tratar una enfermedad dada, es el contexto de variantes de Fc. Así la selectividad o especificidad del receptor de Fc de una variante dada de Fc proporcionará propiedades diferentes dependiendo lo mismo de la composición del anticuerpo, de la fusión de Fc o de las variantes de Fc con una pareja de fusión acoplada. En una modalidad, la especificidad de un receptor de Fc de la variante de Fc descrita en la presente determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante dada de Fc para propósitos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno objetivo y de la enfermedad o indicación tratada. Para algunos objetivos e indicaciones, la mayor afinidad de FcγRIIb y la reducción de las funciones efectoras mediadas por FcγR activador pueden ser beneficiosas. Para otros antígenos objetivos y aplicaciones terapéuticas, es quizás beneficioso aumentar la afinidad para FcγRIIb, o aumentar la afinidad para ambos FcγRIIb y receptores activadores.

Medios para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE

En la presente se describen los medios para alterar la afinidad de uno o más FcγRs. En una modalidad preferida, la afinidad se altera para el receptor inhibitorio FcγRIIb, de este modo alterando la capacidad de la inmunoglobulina para mediar una o más funciones efectoras inhibitorias mediadas por FcγRIIb. Los medios de la invención incluyen modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, medios posicionales para la optimización de la función, etc.) y modificaciones de glicofomas (por ejemplo medios para las modificaciones de glicofomas).

Modificaciones de aminoácidos

5 En la presente se describen inmunoglobulinas que comprenden modificaciones de aminoácidos, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad de uno o más FcγRs. Preferentemente, dichas modificaciones de aminoácidos aumentan la afinidad para FcγRIIb. Sin embargo, en algunas modalidades las modificaciones pueden aumentar la afinidad a uno o más receptores activadores, por ejemplo FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa. Las modificaciones para alterar la unión a FcγRs se describen en USSN 11/124,620 (Estados Unidos 2006/0024298 A1) presentado el 5 de mayo de 2005, titulado "Optimized Fc Variants", y USSN 12/156,183 (Estados Unidos 2009/0136485 A1) presentado el 30 de mayo de 2008, titulado "Methods and Compositions for inhibiting CD32b Expressing Cells".

10 Como se describe en la presente, medios posicionales para la optimización de la actividad de los anticuerpos anti-IgE incluyen pero sin limitarse a modificaciones de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de la cadena pesada (por ejemplo, en las posiciones: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, y 332) lo cual permite modificaciones de las propiedades de unión, funciones efectoras y potencialmente propiedades clínicas de los anticuerpos de la inmunoglobulina FcγRIIb

15 Particularmente, los medios de sustitución para la optimización de la actividad de anticuerpos anti- IgE, por ejemplo alterando la afinidad por FcγRIIb, incluyen pero sin limitarse a una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones de la región constante: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, y 332, en donde la numeración está de acuerdo al índice de la UE. Adecuadamente, los medios de sustitución incluyen al menos una (por ejemplo, dos o más) sustitución(es) comparadas con la región Fc parental, donde dicha(s) modificación(es) está(n) en las posiciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, y 332, de acuerdo al índice de la UE. Adecuadamente, los medios de sustitución incluyen uno o más (por ejemplo dos o más) sustitución(es) en las posiciones seleccionadas a partir del grupo que consiste de 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, de acuerdo con el índice de la UE.

20 Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234F, 234G, 234I, 234K, 234N, 234P, 234Q, 234S, 234V, 234W, 234Y, 234D, 234E, 235A, 235E, 235H, 235I, 235N, 235P, 235Q, 235R, 235S, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236F, 236H, 236I, 236K, 236L, 236M, 236P, 236Q, 236R, 236S, 236T, 236V, 236W, 236Y, 236A, 236E, 236N, 237A, 237E, 237H, 237K, 237L, 237P, 237Q, 237S, 237V, 237Y, 237D, 237N, 239D, 239E, 239N, 239Q, 265E, 266D, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298D, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327G, 327L, 327N, 327Q, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 329E, 330D, 330H, 330K, 330S, 331 S, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234N, 234F, 234D, 234E, 234W, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327L, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 330D, 330H, 330K, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustitución(es), dos o más sustitución(es), etc.) seleccionadas del grupo que consiste de 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, y 328Y, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE.

25 Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328, y 328/332, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 235/267, 236/267, 236/268, 239/267, 267/268, y 267/328, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución es al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de sustituciones) seleccionadas del grupo que consiste de 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 234E/328F, 234W/239D, 234W/239E, 234W/267E, 234W/328Y, 235D/267E, 235D/328F, 235F/239D, 235F/267E, 235F/328Y, 235Y/236D, 235Y/239D, 235Y/267D, 235Y/267E, 235Y/268E, 235Y/328F, 236D/239D, 236D/267E, 236D/268E, 236D/328F, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 239D/268D, 239D/268E, 239D/327D, 239D/328F, 239D/328W, 239D/328Y, 239D/332E, 239E/267E, 266M/267E, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267E/327D, 267E/327E, 267E/328F,

267E/328I, 267E/328Y, 267E/332E, 268D/327D, 268D/328F, 268D/328W, 268D/328Y, 268D/332E, 268E/328F, 268E/328Y, 327D/328Y, 328F/332E, 328W/332E, y 328Y/332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE.

5 Adecuadamente, dicho medio de sustitución resulta en al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución resulta en al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE. Adecuadamente, dicho medio de sustitución resulta en al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 236D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E

Adecuadamente, dicho medio de sustitución resulta en al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E, y 267E/328F, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE.

50 Adecuadamente, la inmunoglobulina puede comprender medios para modificaciones isotópicas, esto es, modificaciones en una IgG parental al aminoácido tipo en una IgG alterna. Por ejemplo, una variante híbrida de IgG1/IgG3 puede construirse por un medio de sustitución para la sustitución de posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 con los aminoácidos de IgG3 en las posiciones donde los dos isotipos difieren. Así una variante híbrida de anticuerpo IgG puede construirse que comprenda uno o más medios de sustitución, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, y 436F. Adecuadamente, una variante híbrida de IgG1/IgG2 puede construirse por un medio de sustitución para sustituir posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 con un aminoácido a partir de IgG1 en las posiciones donde los dos isotipos difieren. Así una variante híbrida de anticuerpo IgG puede construirse que comprenda uno o más medios de

sustitución, por ejemplo una o más de los siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (que refieren a una inserción de una glicina en la posición 236) y 327A.

Modificaciones de glicofomas

5

Muchos polipéptidos, que incluyen los anticuerpos, están sujetos a una variedad de modificaciones postraduccionales que involucran porciones de carbohidratos, así como glicosilación con oligosacáridos. Hay varios factores que pueden influenciar en la glicosilación. Las especies, tejidos y tipo de célula han mostrado ser todos importantes en la manera que ocurre la glicosilación. Adicionalmente el ambiente extracelular por medio de las condiciones de cultivo alteradas tal como la concentración de suero, puede tener un efecto directo sobre la glicosilación (Lifely y otros, 1995, *Glycobiology* 5(8): 813-822).

10

Todos los anticuerpos contienen carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos unidos a N. Aparte de los carbohidratos unidos a la cadena pesada, hasta el 30% de las IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. La IgG tiene un único carbohidrato de dos antenas unido a N en el Asn297 del dominio CH2. Para la IgG de suero ya sea producida ex vivo en hibridomas o células diseñadas mediante ingeniería genética, las IgG son heterogéneas con respecto al carbohidrato unido a Asn297 (Jefferis y otros, 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76; Wright y otros, 1997, *Trends Biotech* 15:26-32). Para la IgG humana, el oligosacárido núcleo consiste normalmente en $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}$, con números de residuos externos variables.

15

20

Las porciones de carbohidratos de las inmunoglobulinas descritas en la presente serán descritas con referencia a la nomenclatura comúnmente usada para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química de los carbohidratos la cual usa esta nomenclatura se encuentra en Hubbard y otros 1981, *Ann. Rev. Biochem.* 50:555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen por las abreviaturas NeuNAc para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para el 5-glicolilneuramínico.

25

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen uno o más azúcares simples unidos entre sí por ejemplo de dos a aproximadamente doce azúcares simples unidos entre sí) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente unidas al esqueleto de la glicoproteína a través de enlaces N u O indistintamente. Los oligosacáridos de las inmunoglobulinas descritas en la presente están generalmente unidos al dominio CH2 o a una región Fc como oligosacáridos unidos a N. La "glicosilación unida a N" se refiere a la unión de la porción carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El técnico con experiencia reconocerá que, por ejemplo, cada uno de los dominios de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murinas así como también IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD CH2 humanas tiene un sitio único de glicosilación unida a N al residuo de aminoácido 297 (Kabat y otros *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991).

30

35

Para los propósitos de la presente descripción, una "estructura madura de núcleo de carbohidratos" se refiere a una estructura de carbohidrato central procesado unido a una región Fc que generalmente consta de la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc (Fucosa) GlcNAc-Man- (Man-GlcNAc)₂ típica de oligosacáridos bicatenarios. La estructura madura de núcleo de carbohidrato se une a la región Fc de la glicoproteína, generalmente a través de la unión a N de Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc. Un "GlcNAc bisecado" es un residuo GlcNAc unido a la β 1,4 manosa de la estructura madura de núcleo de carbohidrato. El GlcNAc bisecado puede estar enzimáticamente unido a la estructura madura de núcleo de carbohidrato por una enzima β (1,4) N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). Las células CHO normalmente no expresan GnTIII (Stanley y otros, 1984, *J. Biol. Chem.* 261:13370-13378), pero pueden diseñarse mediante ingeniería genética para hacerlo (Umaña y otros, 1999, *Nature Biotech.* 17:176-180).

40

45

Se describen en la presente variantes de Fc que comprenden glicofomas modificadas o glicofomas diseñadas mediante ingeniería genética. Por "glicofoma modificada" o "glicofoma diseñada mediante ingeniería genética" como se usa en la presente se entiende una composición de carbohidratos que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidratos difiere químicamente de la de una proteína parental. Las glicofomas diseñadas mediante ingeniería genética pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen pero sin limitarse a aumentar o reducir la función efectora mediada por Fc γ R. En una modalidad, las inmunoglobulinas descritas en la presente son modificadas para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que se unen covalentemente a la región Fc.

50

55

Una variedad de métodos son bien conocidos en la técnica para generar glicofomas modificadas (Umaña y otros, 1999, *Nat*

Biotechnol 17:176-180; Davies y otros, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); (Estados Unidos 6,602,684; USSN 10/277,370 (Estados Unidos 2003-0157108) USSN 10/113,929 (Estados Unidos 2003-0003097 A1) PCTWO 00/61739A1; PCT documento WO 01/29246A1; PCT documento WO 02/31140A1; PCT documento WO 02/30954A1); (Potelligent™ technology [Blowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMab™ [GLYCART biotechnology AG, Zürich, Switzerland]). Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que se unen covalentemente a la región Fc, por ejemplo mediante la expresión de una IgG en diversos organismos o líneas celulares, diseñados mediante ingeniería genética o de cualquier otra manera (por ejemplo células Lec-13 CHO o células de hibridoma de rata YB2/O), mediante la regulación de las enzimas involucradas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o mediante la modificación de carbohidrato (s) después que IgG se ha expresado. Otros métodos para modificar las glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen el uso de cepas glicodiseñadas de levadura (Li y otros, 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), musgo (Nechansky y otros, 2007, Mol Immunol 44(7):1826-8), y plantas (Cox y otros, 2006, Nat Biotechnol 24(12):1591-7). El uso de un método en particular para generar una glicofoma modificada no está destinado a limitar las modalidades a ese método. Más bien, las modalidades descritas en la presente abarcan variantes de Fc con glicofomas modificadas independientemente de la forma en que se producen.

En una modalidad, las inmunoglobulinas descritas en la presente se han glicodiseñado para alterar el nivel de sialilación. Los niveles más altos de glicanos sialilados en Fc en moléculas de inmunoglobulina G pueden afectar adversamente a la funcionalidad (Scallon y otros, 2007, Mol Immunol. 44(7):1524-34), y las diferencias en los niveles de sialilación de Fc pueden resultar en actividad antiinflamatoria modificada (Kaneko y otros, 2006, Science 313:670-673). Debido a que los anticuerpos pueden adquirir propiedades antiinflamatorias tras la sialilación del núcleo de polisacárido de Fc, puede ser ventajoso glicodiseñar las inmunoglobulinas descritas en la presente para mayor o menor contenido de ácido siálico en Fc.

Glicofoma diseñada mediante ingeniería genética típicamente se refiere a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; así por ejemplo una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma diseñada mediante ingeniería genética. Alternativamente, glicofoma diseñada mediante ingeniería genética puede referirse a la inmunoglobulina que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos. En una modalidad, una composición descrita en la presente comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, por ejemplo, 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc de los anticuerpos en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de fucosa. En otra modalidad, el anticuerpo en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de fucosa y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. En una modalidad alternativa, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, por ejemplo 80-100%, o 90-100%, de los anticuerpos en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de fucosa. En otra modalidad, el anticuerpo en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. En otra modalidad alternativa, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100%, etc. de los anticuerpos en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de fucosa. En otra modalidad, el anticuerpo en la composición comprende una estructura madura de núcleo de carbohidrato que carece de ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácidos en la región Fc. En otra modalidad, la combinación de la glicofoma diseñada mediante ingeniería genética y la modificación de aminoácidos proporciona propiedades de unión óptimas del anticuerpo al receptor Fc.

Otras Modificaciones

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que optimizan propiedades que no están específicamente relacionadas con Fc γ R- o funciones efectoras mediadas por complemento en sí. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácido, o pueden ser modificaciones que se hacen enzimáticamente o químicamente. Dicha(s) modificación(es) probablemente proporcionan alguna mejora en la inmunoglobulina, por ejemplo una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. En la presente se describe una variedad de mejoras que pueden hacerse mediante el acoplamiento de las inmunoglobulinas descritas en la presente con modificaciones adicionales.

En una modalidad, la región variable de un anticuerpo descrito en la presente puede madurarse por afinidad, es decir que se han hecho modificaciones de aminoácidos en los dominios VH y/o VL del anticuerpo para mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno objetivo. Tales tipos de modificaciones pueden mejorar la asociación y/o la cinética de disociación para la unión al antígeno objetivo. Otras modificaciones incluyen las que mejoran la selectividad para el antígeno objetivo contra objetivos alternativos. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad para el antígeno expresado en el objetivo contra las

células no objetivo. Otras mejoras en las propiedades de reconocimiento del objetivo pueden ser proporcionadas por modificaciones adicionales. Tales propiedades pueden incluir, pero sin limitarse a, propiedades cinéticas específicas (es decir cinéticas de asociación y disociación), la selectividad para el objetivo particular contra objetivos alternativos, y la selectividad para una forma específica de objetivo frente a formas alternativas. Los ejemplos incluyen variantes en toda su extensión frente a variantes de empalme, formas de superficie celular contra formas solubles, selectividad para diferentes variantes polimórficas, o selectividad para las formas conformacionales específicas del antígeno objetivo. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan internalización reducida o mejorada de una inmunoglobulina.

En una modalidad, se hacen modificaciones para mejorar las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas descritas en la presente, que incluyen pero sin limitarse a la estabilidad, la solubilidad, y el estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, las sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la inmunoglobulina tales como para proporcionar una mayor estabilidad, o la sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares para mayor solubilidad. Otras modificaciones otorgadas a las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen las que permiten la formación específica de moléculas homodiméricas o homomultiméricas. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a disulfuros diseñados, así como también modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar homodiméricos o homomultímeros covalentes. Modificaciones adicionales otorgadas a las variantes descritas en la presente incluyen las que permiten la formación específica de moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales, y/o multifuncionales. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a, una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio CH3, en el que las sustituciones reducen la formación de homodímero y aumentan la formación de heterodímeros. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios bisagra y CH3, en los que las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

En modalidades adicionales, las inmunoglobulinas descritas en la presente comprenden modificaciones que eliminan los sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasa que reducen los rendimientos de producción, así como también los sitios de proteasas que degradan la proteína administrada *in vivo*. En una modalidad, se hacen modificaciones adicionales para eliminar los sitios de degradación covalentes tales como los sitios de desamidación (es decir, la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo), de oxidación, y de degradación proteolítica. Sitios de desamidación que son especialmente útiles de eliminar son aquellos que tienen propensión mejorada a la desamidación, que incluyen, pero sin limitarse a asparaginilo y residuos glutamilo seguido por glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En tales casos, la sustitución de cualquiera de los residuos puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Sitios de oxidación comunes incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que pueden o bien ser introducidas o eliminadas, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los "grupos aminos de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal, modificaciones adicionales también pueden incluir, pero sin limitarse a modificaciones postraduccionales tales como la glicosilación y fosforilación unida a N o unida a O.

Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran los rendimientos de la expresión y/o purificación de los huéspedes o células huésped usados comúnmente para la producción de biológicos. Estos incluyen, pero sin limitarse a diversas líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, CHO), líneas celulares de levadura, líneas celulares bacterianas, y plantas. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro entre cadenas. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracatenarios.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados mediante el uso de, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colaboradores, que incluyen pero sin limitarse a los métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson y otros, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(2):7566-71, Zhang y otros, 2003, 303(5656):371-3, y Chin y otros, 2003, Science 301(5635):964-7. En algunas modalidades, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades, funcionales, inmunológicas, biofísicas o de fabricación discutidas anteriormente. En modalidades adicionales, estas modificaciones permiten la modificación química adicional para otros propósitos. Otras modificaciones se contemplan en la presente. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede unirse a una de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Las modificaciones adicionales de aminoácidos pueden incluirse para permitir la modificación química específica o no específica o postraduccionales de las inmunoglobulinas. Dichas modificaciones, incluyen, pero sin limitarse a PEGilación y glicosilación. Sustituciones específicas que pueden utilizarse para permitir la PEGilación incluyen, pero sin limitarse a, la introducción de nuevos residuos de cisteína o aminoácidos no naturales de manera que químicas de acoplamiento eficientes y específicas

pueden usarse para conectar un PEG o un resto polimérico de cualquier otra manera. La introducción de sitios de glicosilación específicos puede lograrse mediante la introducción de nuevas secuencias N-X-T/S en las inmunoglobulinas descritas en la presente.

5 Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia parental a las proteínas del MHC. Por ejemplo, modificaciones de aminoácidos podrían diseñarse mediante ingeniería genética de tal manera que no hay ni un número mínimo de epítomos inmunitarios que se predice se unirán, con alta afinidad, a cualquiera de los alelos MHC prevalentes. Varios métodos de identificación de epítomos de unión a MHC en las secuencias de proteínas son conocidos en la técnica y pueden usarse para anotar epítomos en un anticuerpo descrito en la presente. Ver por ejemplo USSN 09/903,378 (Estados Unidos 2002-0119492 A1) USSN 10/754,296 (Estados Unidos 2004-0230380 A1) USSN 11/249,692 (Estados Unidos 2006-0148009 A1) y las referencias citadas en ellas.

15 En algunas modalidades, las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden combinarse con inmunoglobulinas que alteran la unión a FcRn. Tales variantes pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas a las inmunoglobulinas. Las variantes preferidas que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen pero sin limitarse a las sustituciones en las posiciones 259, 308, 428, y 434, que incluyen pero sin limitarse a, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434f, 434Y, y 434M (PCT/US2008/088053, (documento WO 2009086320 A1) presentado el 22 de diciembre e 2008, titulado "Fc Variants with Alterned Binding to FcRn"). Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen pero sin limitarse a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton y otros, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton y otros 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields y otros, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311 S (Dall'Acqua y otros Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua y otros, 2006, The Journal of biological chemistry 281:23114-23524).

25 Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del alcance de las inmunoglobulinas descritas en la presente, y son generalmente hechas, pero no siempre, post-traduccionalmente. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminal.

30 En algunas modalidades, la modificación covalente de los anticuerpos descritos en la presente comprende la adición de uno o más etiquetas. El término "grupo etiqueta" significa cualquier etiqueta detectable. En algunas modalidades, el grupo etiqueta se acopla al anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. Varios métodos para marcaje de proteínas son conocidos en la técnica y pueden usarse en la generación de las inmunoglobulinas descritas en la presente.

40 Conjugados

En una modalidad, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente son anticuerpos "proteínas de fusión", a veces referidas en la presente como "anticuerpos conjugados". La pareja de fusión o pareja conjugada puede ser proteica o no proteica; esta último generalmente se genera mediante el uso de grupos funcionales en el anticuerpo y en la pareja conjugada. Las parejas conjugadas y de fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de moléculas pequeñas y polipéptidos. Por ejemplo, una variedad de conjugados de anticuerpos y los métodos se describen en Trail y otros, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Posibles parejas conjugadas incluyen, pero sin limitarse a las citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas modalidades, las parejas conjugadas pueden considerarse más como cargas útiles, es decir que el objetivo de un conjugado es el suministro dirigido de la pareja conjugada a una célula objetivo, por ejemplo una célula cancerosa o célula inmune, por la inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la conjugación de una toxina a una inmunoglobulina dirige el suministro de dicha toxina a células que expresan el antígeno objetivo. Como se apreciará por un experto en la técnica, en realidad los conceptos y las definiciones de fusión y conjugado se sobrelapan. La designación de una fusión o conjugado no está destinada a limitar a cualquier modalidad particular descrita en la presente. Más bien, estos términos se usan libremente para transmitir el concepto amplio de que cualquier inmunoglobulina descrita en la presente puede estar relacionada genéticamente, químicamente, o de cualquier otra manera, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Conjugados adecuados incluyen, pero sin limitarse a, las etiquetas como se describe más abajo, los fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, pero sin limitarse a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o

fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus correspondientes fragmentos incluyen cadena A de la difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos incluyen también productos radioquímicos hechos mediante la conjugación de radioisótopos a anticuerpos, o la unión de un radionúclido a un agente quelante que se ha unido covalentemente al anticuerpo. Modalidades adicionales usan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina y duocarmicinas y análogos.

Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente están fusionadas o conjugadas a una citocina. Por "citocina" como se usa en la presente se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet y otros, 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, las citocinas pueden fusionarse a un anticuerpo para proporcionar un conjunto de propiedades deseables. Ejemplos de dichas citocinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas incluidas están la hormona de crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionil, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como la hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógenogamma placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibinabeta; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrinas; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento del nervio tales como el NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF beta; factor de crecimiento I y II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos, interferones tales como el interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF) y granulocitos-CSF (G-CSF), interleucinas (IL), como la IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de necrosis tumoral como el TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden conjugarse a un "receptor" (tal como estreptavidina) para el uso en el predireccionamiento de tumores en donde el conjugado inmunoglobulina-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación mediante el uso de un agente aclarante y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) el cual se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un fármaco o radionucleótido). En una modalidad alternativa, la inmunoglobulina se conjuga o se une operativamente a una enzima para emplear Terapia de Profármaco Dependiente de Anticuerpo mediada por enzimas (ADEPT). ADEPT puede usarse por conjugación o unir operativamente la inmunoglobulina a una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidil).

Cuando las parejas de inmunoglobulina se usan como conjugados, la pareja conjugada puede unirse a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en la presente, incluyendo en los extremos N o C-terminales, o en algún residuo entre los terminales. Una variedad de enlazadores pueden encontrar uso en las inmunoglobulinas descritas en la presente para unir covalentemente a las parejas conjugadas a una inmunoglobulina. Por "enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de inmovilización" o equivalentes gramaticales de los mismos, en la presente se entiende una molécula o grupo de moléculas (tales como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para colocar dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos en la técnica; por ejemplo, enlazadores homo- o hetero-bifuncionales que son bien conocidos (véase, catálogo 1994 Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200). Una serie de estrategias puede usarse para unir covalentemente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero sin limitarse a las uniones de polipéptidos entre N- y C-terminales de proteínas o dominios de proteínas, la unión a través de enlaces disulfuro, y la unión a través de reactivos de químicos de reticulación. En un aspecto de esta modalidad, el enlazador es un enlace peptídico, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que es adecuada para unir dos moléculas de tal manera que asumen la conformación correcta con relación a otra de manera que retienen la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. En una modalidad, el enlazador es de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud, por ejemplo, un enlazador puede ser de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (que se expone como sec. con núm. de ident.: 1), (GGGS)_n (que se expone como sec. con núm. de ident.: 2) y (GGGS)_n (que se expone como sec. con núm. de ident.: 3), donde n es un número entero de al menos uno), los polímeros glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlaces flexibles, tal como será apreciado por los expertos en la técnica. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, pero sin limitarse a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores.

Producción de Moléculas de coacoplamiento

Además se describen en la presente métodos para producir y probar experimentalmente moléculas de coacoplamiento. Los métodos descritos no están destinados a limitar las modalidades a cualquier aplicación o teoría de operación particular. Más bien, los métodos proporcionados están destinados a ilustrar generalmente que una o más inmunoglobulinas pueden ser producidas y probadas experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales para biología molecular, expresión, purificación y detección de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76; *Antibodies: A Laboratory Manual* by Harlow & Lane, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

Adecuadamente, se crean los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coacoplamiento, y que después pueden clonarse en células huésped, expresarse y someterse a ensayo, si se desea. Así, los ácidos nucleicos, y en particular ADN, pueden hacerse para que codifiquen cada secuencia de la proteína. Estas prácticas se llevan a cabo mediante el uso de procedimientos conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3ra Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como se apreciará por aquellos con experiencia en la técnica, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un gran número de secuencias es potencialmente costoso y consume tiempo. Por "biblioteca" en la presente se entiende un conjunto de variantes en cualquier forma, que incluye pero sin limitarse a una lista de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, una lista de sustituciones de ácidos nucleicos o de aminoácidos en las posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes, ya sea en forma purificada o impura. En consecuencia, hay una variedad de técnicas que pueden usarse para generar eficientemente las bibliotecas descritas en la presente. Tales métodos incluyen, pero sin limitarse a métodos de ensamble de genes, métodos basado en la PCR y los métodos que usan variaciones de la PCR, los métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, métodos de combinados de oligo tales como los usados en combinación aleatoria sintética, métodos de amplificación propensos a errores y métodos que usan oligos con mutaciones al azar, métodos clásicos de mutagénesis dirigida, mutagénesis de casete, y otros métodos de amplificación y síntesis de genes. Como es conocido en la técnica, hay una variedad de kits comercialmente disponibles y métodos para el ensamble de genes, mutagénesis, vectores de subclonación, y similares, y tales productos comerciales encuentran uso en la generación de ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden producirse por cultivo de una célula huésped transformada con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica las moléculas de coacoplamiento, en las condiciones adecuadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Las condiciones adecuadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y será fácilmente comprobada por un experto en la técnica a través de experimentación de rutina. Una amplia variedad de células huésped adecuadas puede usarse, que incluye pero sin limitarse a células de mamíferos, bacterias, células de insectos y de levadura. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible de la American Type Culture Collection.

Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, que incluyen los sistemas en los que se introducen las construcciones de expresión en las células de mamífero mediante el uso de virus tales como retrovirus o adenovirus. Cualquier célula de mamífero puede usarse, por ejemplo, células humanas, de ratón, de rata, de hámster y de primates. Las células adecuadas incluyen además células de investigación conocidas, que incluyen, pero sin limitarse a células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NS0 y variantes de los mismos. Convenientemente, las proteínas de la biblioteca se expresan en células bacterianas. Sistemas de expresión bacterianos son bien conocidos en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Sfrectococcus lividans*. Adecuadamente, las inmunoglobulinas se producen en células de insecto (por ejemplo Sf21/Sf9, Trichoplusia ni Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento se expresan *in vitro* mediante el uso de sistemas de traducción libres de células. Sistemas de traducción *In vitro* derivados tanto de procariotas (por ejemplo *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo células de germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y pueden elegirse en base a los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los expertos en la técnica, la traducción, *In vitro* es necesaria para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación de ribosomas. Adicionalmente, las inmunoglobulinas pueden producirse por métodos de síntesis química. También los sistemas de expresión transgénicos tanto animal (por ejemplo leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insectos completas, etc) como de planta (por ejemplo, maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.)

Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser incorporados en un vector de expresión para expresar la proteína. Una variedad de vectores de expresión puede usarse para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores autorreplicantes extracromosómicos o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula huésped. Así, los vectores de expresión que encuentran uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen, pero sin limitarse a los que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insecto, de levadura, y en sistemas *in vitro*. Como es conocido en la técnica, una variedad de vectores de expresión está disponible comercialmente o de cualquier otra manera, que pueden encontrar uso para la expresión de moléculas de coacoplamiento descritas en la presente.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente con las secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en la presente se entiende que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula de coacoplamiento, y son típicamente adecuados para la célula huésped usada para expresar la proteína. Generalmente, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosomal secuencias de inicio y de terminación de la transcripción secuencias de inicio y de terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como además se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen de selección o marcador para permitir la selección de células huéspedes transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

Las moléculas de coacoplamiento pueden estar unidas operativamente a un pareja de fusión para permitir la orientación de la proteína expresada, purificación, detección, presentación, y similares. Las parejas de fusión pueden unirse a la secuencia de inmunoglobulina a través de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora comprenderá generalmente un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también pueden usarse enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras son seleccionadas para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como se apreciará por los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede usarse como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Una pareja de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señalización que dirige la inmunoglobulina y cualquier pareja de fusión asociada a una localización celular deseada o al medio extracelular. Como es conocido en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigir a una proteína que sea secretada ya sea en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Una pareja de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o detección. Tales parejas de fusión incluyen, pero sin limitarse a las etiquetas de polihistidina (HIS-tags) (por ejemplo H₆ y H₁₀ u otras etiquetas para su uso en sistemas de Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado (IMAC) (por ejemplo, Ni⁺² columnas de afinidad)), fusiones a GST, fusiones a MBP, Strep-tag, la secuencia objetivo de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA y etiquetas de epítipo que son el objetivo de los anticuerpos (por ejemplo etiquetas c-myc, etiquetas-flag, y similares). Como se apreciará por los expertos en la técnica, tales etiquetas pueden ser útiles para la purificación, para la detección, o ambas cosas. Por ejemplo, una inmunoglobulina puede purificarse mediante el uso de un His-tag inmovilizándolo a una columna de afinidad de Ni⁺² y, a continuación, después de la purificación la misma His-tag puede usarse para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta de Ni⁺² para llevar a cabo un ELISA u otro ensayo de unión (como se describe más abajo). Una pareja de fusión puede permitir el uso de un método de selección para detectar inmunoglobulinas (ver más abajo). Las parejas de fusión que permiten una variedad de métodos de selección son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, mediante la fusión de los miembros de una biblioteca de inmunoglobulina de la proteína del gen III, puede emplearse presentación en fagos (Kay y otros, Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman y otros, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Las parejas de fusión pueden permitir que las inmunoglobulinas sean etiquetadas. Alternativamente, una pareja de fusión puede unirse a una secuencia específica en el vector de expresión, lo que permite a la pareja de fusión y a la inmunoglobulina asociada unirse covalentemente o no covalentemente con el ácido nucleico que los codifica. Los métodos de introducción de ácido nucleico exógeno en células huésped son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula huésped usada. Las técnicas incluyen pero sin limitarse a transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o fago, la encapsulación del polinucleótido (s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamíferos, la transfección puede ser transitoria o estable.

Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento se purifican y aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación

estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrófoba, de afinidad, de tamaño o de filtración en gel, y de fase reversa, llevado a cabo a presión atmosférica o a alta presión mediante el uso sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación incluyen también técnicas electroforéticas, inmunológicas, precipitación, diálisis, y de cromatoenfoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, conjuntamente con concentración de proteínas, también son útiles. Como es bien conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se unen a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden encontrar uso para la purificación de las inmunoglobulinas descritas en la presente. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Del mismo modo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como lo hace por supuesto el antígeno objetivo del anticuerpo. La purificación a menudo puede activarse por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden purificarse mediante el uso de resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad, Ni⁺² si se emplea una His-tag, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se emplea una flag-tag. Para una orientación general en técnicas de purificación adecuadas, véase, por ejemplo, constituida en su totalidad como referencia Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará dependiendo del tamiz o el uso de las inmunoglobulinas. En algunos casos no es necesaria purificación. Por ejemplo en un caso, si se secretan las inmunoglobulinas, la detección puede tener lugar directamente del medio. Como es bien conocido en la técnica, algunos métodos de selección no involucran la purificación de proteínas. Así, por ejemplo, si una biblioteca de inmunoglobulinas se hace en una biblioteca de presentación de fagos, puede no llevarse a cabo la purificación de proteínas.

Experimentación In Vitro

Las moléculas de coacoplamiento pueden seleccionarse mediante el uso de una variedad de métodos, que incluyen, pero sin limitarse a los que usan ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo* basados en células, y tecnologías de selección. Tecnologías de automatización y tamizaje de alto rendimiento pueden usarse en los procedimientos de tamizaje. El tamizaje puede emplear el uso de una pareja de fusión o etiqueta. El uso de parejas de fusión se ha discutido anteriormente. Por "etiquetado" en la presente se entiende que las inmunoglobulinas descritas en este documento tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un tamiz. En general, las etiquetas se dividen en tres clases: a) las etiquetas inmunes, que puede ser un epítipo incorporado como pareja de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, que puede ser isótopos radiactivos o pesados, y c) las etiquetas de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como la biotina que permiten a otros métodos de marcaje. Las etiquetas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de la proteína.

Adecuadamente, las propiedades funcionales y/o biofísicas de moléculas de coacoplamiento son examinadas en un ensayo *in vitro*. Los ensayos *In vitro* pueden permitir un amplio intervalo dinámico para la selección de propiedades de interés. Las propiedades que pueden ser seleccionadas incluyen pero sin limitarse a la estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos Fc, por ejemplo FcγRs. Múltiples propiedades pueden tamizarse simultáneamente o individualmente. Las proteínas pueden ser purificadas o impuras, dependiendo de los requisitos del ensayo. Adecuadamente, el tamiz es un ensayo de unión cualitativa o cuantitativa para la unión de moléculas de coacoplamiento a una proteína o molécula no proteica que se sabe o se cree que se une a la molécula de coacoplamiento. Adecuadamente, el tamiz es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno objetivo. Adecuadamente, el tamiz es un ensayo para la unión de moléculas de coacoplamiento a un ligando Fc, que incluye, pero sin limitarse a la familia de FcγRs, el receptor FcRn neonatal, la proteína de complemento C1q, y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos Fc pueden ser de cualquier organismo. Adecuadamente, los ligandos Fc son de seres humanos, ratones, ratas, conejos, y/o monos. Los ensayos de unión pueden llevarse a cabo mediante el uso de una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero sin limitarse a ensayos basados en FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia) y BRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo Amplificado Luminescente Homogéneo de Proximidad), Ensayo de Proximidad de Centelleo, ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima), SPR (Resonancia de Plasmón Superficial, también conocido como BiaCore®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel y cromatografía que incluye filtración en gel. Estos y otros métodos pueden tomar ventaja de algunas parejas de fusión o de la etiqueta de la inmunoglobulina. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, que incluyen pero sin limitarse a etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicas.

Las propiedades biofísicas de las moléculas de coacoplamiento, por ejemplo la estabilidad y solubilidad, se pueden ensayar mediante el uso de una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de la proteína puede determinarse midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desplegado. Por ejemplo, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser desplegadas mediante el uso de química desnaturante, calor, o pH, y esta transición puede controlarse mediante el uso de métodos que incluyan pero sin limitarse a la espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbancia, espectroscopia de RMN, calorimetría, y proteólisis. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos del plegado y las transiciones que se desarrollan

también pueden controlarse mediante el uso de estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural global de una molécula de coacoplamiento pueden determinarse cuantitativamente o cualitativamente mediante el uso de una amplia variedad de métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos que pueden encontrar uso para la caracterización de las propiedades biofísicas de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente incluyen electroforesis en gel, isoelectroenfoque, electroforesis capilar, cromatografía, tal como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa, mapeo de péptidos, oligosacáridos mapeo, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbancia ultravioleta, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, ultra-centrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, proteólisis, y reticulación, medición de la turbidez, ensayos de retardo en filtro, ensayos inmunológicos, ensayos fluorescentes de tinte de unión, ensayos de tinción de proteína, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. El análisis estructural empleando técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopia de RMN pueden además encontrar uso. En una modalidad, la estabilidad y/o solubilidad pueden medirse mediante la determinación de la cantidad de solución de proteína después de un periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede o no estar expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo elevada temperatura, bajo pH, o la presencia de desnaturalizante. Debido a que la función requiere normalmente una proteína estable, soluble, y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión antes mencionados también proporcionan formas de realizar una medición de este tipo. Por ejemplo, una solución que comprende una inmunoglobulina podría ensayarse por su capacidad para unirse al antígeno objetivo, luego se expone a temperatura elevada durante uno o más períodos de tiempo definidos, luego son ensayados de nuevo para la unión al antígeno. Debido a que no se espera que la proteína desplegada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medida de la estabilidad y la solubilidad de la molécula de coacoplamiento.

Adecuadamente, moléculas de coacoplamiento pueden ser probados mediante el uso de uno o más ensayos *in vitro* o basados en células. Para tales ensayos, las inmunoglobulinas, purificadas o no purificadas, se añaden típicamente de forma exógena de tal manera que las células se exponen a variantes individuales o grupos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos están basados típicamente, pero no siempre, en la biología de la capacidad de unirse al antígeno objetivo y mediar algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo funciones efectoras, como la lisis celular, fagocitosis, inhibición de la unión ligando/receptor, inhibición de crecimiento y/o proliferación, apoptosis y similares. Tales ensayos a menudo involucran el seguimiento de la respuesta de las células a la inmunoglobulina, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, fagocitosis celular, lisis celular, el cambio en la morfología celular, o la activación transcripcional tales como la expresión celular de un gen natural o gen reportero. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de las moléculas de coacoplamiento para provocar ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, es decir además de las células objetivo, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, seres humanos, ratones, rata, conejo, y mono. Anticuerpos reticulados o monoméricos pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan el antígeno objetivo del anticuerpo, o pueden mediar el ataque en células objetivo por células inmunes que se han añadido al ensayo. Los métodos de monitoreo para la muerte celular o la viabilidad son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos fluoróforos, inmunoquímicos, citoquímicos, y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de caspasa o de conjugados de anexina-flúor pueden permitir la medida de la apoptosis, y la absorción o liberación de sustratos radioactivos (por ejemplo, los ensayos de liberación de cromó-51) o reducción metabólica de colorantes fluorescentes tales como azul alamar pueden permitir que sea monitoreados el crecimiento celular, la proliferación o activación. En una modalidad, se usa el ensayo de citotoxicidad DELFIA® basado en EuTDA (Perkin Elmer, MA). Alternativamente, las células objetivo muertas o dañadas pueden ser controladas mediante la medición de la liberación de una o más proteínas intracelulares naturales, por ejemplo lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede monitorizarse mediante el ensayo de genes naturales o proteínas que pueden ser activadas o reprimidas, por ejemplo se puede medir la liberación de ciertas interleucinas, o alternativamente la lectura puede ser a través de una luciferasa o una construcción reportera GFP. Los ensayos basados en células además pueden involucrar la medida de los cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una inmunoglobulina. Los tipos de células para tales ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y una variedad de líneas celulares que son conocidas en la técnica pueden ser empleadas. Alternativamente, los tamizajes basados en células se realizaron mediante el uso de células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coacoplamiento.

Los ensayos *In vitro* incluyen pero sin limitarse a ensayos de unión, ADCC, CDC, citotoxicidad, proliferación, liberación de peróxido/ozono, quimiotaxis de células efectoras, inhibición de tales ensayos por la función efectora reducida de anticuerpos; intervalo de actividades tales como mejora >100x o reducción >100x, mezclas de activación del receptor y los resultados de ensayo que se esperan de este tipo de perfiles de los receptores.

Experimentación In Vivo

Las propiedades biológicas de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser caracterizadas en células, tejidos, y experimentos de organismo entero. Como es conocido en la técnica, los fármacos se prueban a menudo en animales, incluyendo pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra un modelo de enfermedad o enfermedad, o para medir la farmacocinética de un fármaco, toxicidad y otras propiedades. Dichos animales pueden referirse como modelos de enfermedad. Con respecto a las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente, se plantea un reto particular cuando se usan modelos animales para evaluar la eficacia potencial de los polipéptidos candidatos en pruebas con humanos - esto es debido, al menos en parte, al hecho de que las moléculas de coacoplamiento que tienen un efecto específico en la afinidad para un receptor de Fc humano no puede tener un efecto similar afinidad con el receptor ortólogo de animales. Estos problemas pueden ser exacerbados por las ambigüedades inevitables asociadas con la correcta asignación de los verdaderos ortólogos (Mechetina y otros., Immunogenetics, 2002 54:463-468), y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal (por ejemplo, los seres humanos poseen un FcγRIIIa mientras que los ratones que no lo tienen). La terapéutica a menudo se prueba en ratones, que incluyen pero sin limitarse a las cepas de ratón NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y transgénicos (que incluyen ratones con genes bloqueadores y con genes bloqueados). Tales ratones pueden desarrollar diversas enfermedades autoinmunes que se asemejan a patologías autoinmunes sistémicas o enfermedad inflamatoria, específica de órganos humanos como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, una inmunoglobulina descrita en la presente prevista para las enfermedades autoinmunes puede probarse en tales modelos de ratón mediante el tratamiento de los ratones para determinar la capacidad de la inmunoglobulina para reducir o inhibir el desarrollo de la patología de la enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el sistema receptor de Fc gamma humano y de ratón, un enfoque alternativo es usar un modelo murino SCID en el que los ratones inmunodeficientes son injertados con PBL o PBMCs (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) proporcionando un sistema inmune humano semifuncional con células efectoras humanas y receptores Fc. En un modelo tal, un desafío con el antígeno (tal como el toxoide tetánico) activa las células B a diferenciarse en células plasmáticas y segregan inmunoglobulinas, reconstituyendo de este modo la inmunidad humoral específica de antígeno. Por lo tanto, una inmunoglobulina de doble objetivo descrita en la presente que específicamente se une a IgE y FcγRIIb en células B pueden someterse a ensayo para examinar la capacidad de inhibir específicamente la diferenciación de células B. Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha inmunoglobulina de ser usado como agente terapéutico. Otros organismos, por ejemplo, mamíferos, también pueden usarse para pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por lo tanto se pueden usar para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoglobulinas descritas en la presente. Las pruebas de las inmunoglobulinas descritas en la presente en los seres humanos, se requieren en última instancia para su aprobación como medicamentos, y por lo tanto, por supuesto, estos experimentos se contemplan. Así, las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ser probados en seres humanos para determinar su eficacia, toxicidad, farmacocinética, y/o otras propiedades clínicas terapéuticas.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden conferir un rendimiento superior en Fc que contengan agentes terapéuticos en modelos animales o en humanos. Los perfiles de unión al receptor de dichas inmunoglobulinas, como se describe en esta memoria descriptiva, puede, por ejemplo, ser seleccionado para aumentar la potencia de los fármacos citotóxicos o para apuntar a funciones efectoras o células efectoras específicas para mejorar la selectividad de la acción de un fármaco. Además, los perfiles de unión al receptor pueden ser seleccionados que puedan reducir algunas o todas las funciones efectoras, reduciendo así los efectos secundarios o la toxicidad de dicho fármaco que contiene Fc. Por ejemplo, una inmunoglobulina con unión reducida a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa se puede seleccionar para eliminar la mayor función efectora mediada por células, o una inmunoglobulina con unión reducida a C1q puede ser seleccionada para limitar las funciones efectoras mediadas por complemento. En algunos contextos, tales funciones efectoras se sabe que tienen efectos tóxicos potenciales. Por lo tanto la eliminación de ellos puede aumentar la seguridad del fármaco que contiene Fc y tal mejora de la seguridad se puede caracterizar en modelos animales. En algunos contextos, tales funciones efectoras son conocidas por mediar la actividad terapéutica deseable. Por lo tanto la mejora de ellos puede aumentar la actividad o potencia del fármaco que contiene Fc y dicha actividad o potencia mejorada puede ser caracterizada en modelos animales.

Adecuadamente, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser evaluadas por eficacia en modelos animales clínicamente relevantes de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos relevantes incluyen varios animales transgénicos para antígenos y receptores específicos.

Modelos transgénicos relevantes tales como los que expresan receptores de Fc humanos (por ejemplo, CD32b) podrían usarse para evaluar y probar inmunoglobulinas y fusiones a Fc en su eficacia. La evaluación de las moléculas de coacoplamiento por la introducción de genes humanos que directa o indirectamente median la función efectora en ratones u otros roedores pueden permitir estudios fisiológicos de eficacia en los trastornos autoinmunes y RA. Receptores Fc humanos tales como FcγRIIb pueden poseer polimorfismos como el del promotor del gen (-343 de G a C) o un dominio

transmembrana del receptor 187 I o T, que permita además la introducción de polimorfismos humanos específicos y combinaciones en roedores. Los diversos estudios con polimorfismo específico de FcR no se limitan a esta sección, sin embargo abarcan todas las discusiones y las aplicaciones de FcR en general como se especifica en toda esta aplicación. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden conferir una actividad superior en fármacos que contienen Fc en dichos modelos transgénicos, particularmente variantes con perfiles de unión optimizados para la actividad mediada por el FcγRIIb humano puede mostrar una actividad superior en ratones transgénicos CD32b. Mejoras similares en la eficacia en ratones transgénicos para otros receptores de Fc humanos, por ejemplo, FcγRIIIa, FcRI, etc., se puede observar por moléculas de coacoplamiento con perfiles de unión optimizados para los respectivos receptores. Los ratones transgénicos para múltiples receptores humanos mostraría una mejor actividad para inmunoglobulinas con perfiles de unión optimizados para los correspondientes múltiples receptores.

Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el uso de modelos animales para caracterizar la eficacia potencial de anticuerpos candidatos terapéuticos en un paciente humano, algunas variantes de polipéptidos descritos en la presente pueden encontrar utilidad como indicadores para evaluar la eficacia potencial en humanos. Dichas moléculas sustitutas pueden imitar -en el sistema animal- la biología del FcR y/o el complemento de una inmunoglobulina humana candidata correspondiente. Este mimetismo es más probable que se manifieste por afinidades de asociación relativas entre inmunoglobulinas y animales frente a los receptores humanos específicos. Por ejemplo, si uno estuviera usando un modelo de ratón para evaluar el potencial humano en la eficacia de una variante de Fc que ha reducido la afinidad por el inhibidor FcγRIIb humano, una variante sustituta adecuada habría reducido afinidad por el FcγRII de ratón. Además debe señalarse que las variantes de Fc sustitutas podrían crearse en el contexto de una variante de Fc humana, una variante de Fc animal, o ambos.

Adecuadamente, las pruebas de moléculas de coacoplamiento pueden incluir el estudio de eficacia en primates (por ejemplo, modelo de mono cynomolgus) para facilitar la evaluación de la reducción de las células objetivo específicas que albergan el antígeno objetivo. Modelos de primates adicionales incluyen pero sin limitarse al uso del mono rhesus para evaluar polipéptidos Fc en los estudios terapéuticos de autoinmune, trasplante y cáncer.

Se llevan a cabo estudios de toxicidad para determinar anticuerpos o efectos relacionados con fusión a Fc que no pueden ser evaluados en perfiles farmacológicos estándar, o se producen sólo después de la administración repetida del agente. La mayoría de los ensayos de toxicidad se realizan en dos especies - un roedor y un no roedor -para asegurar que cualquier efecto adverso inesperado no se pasa por alto antes de que nuevas entidades terapéuticas se introduzcan en el hombre. En general, estos modelos pueden medir una variedad de efectos tóxicos, que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductiva/desarrollo y la carcinogenicidad. Se incluyen dentro de los parámetros antes mencionados están medidas estándares de consumo de alimentos, peso corporal, formación de anticuerpos, química clínica y el examen macro y microscópico de órganos/tejidos normales (por ejemplo, cardiotoxicidad). Los parámetros adicionales de medición son trauma en el sitio de la inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si los hubiere. Tradicionalmente, la terapéutica de anticuerpos monoclonales, desnudos o conjugados, se evalúan para la reactividad cruzada con tejidos normales, la inmunogenicidad/producción de anticuerpos, toxicidad del conjugado o enlazador y toxicidad "espectador" de especies radioetiquetadas. No obstante, estos estudios pueden tener que ser individualizados para abordar las preocupaciones específicas y siguiendo la orientación establecida por ICH S6 (Estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también señalado anteriormente). Como tal, los principios generales son que los productos están suficientemente bien caracterizados, las impurezas/contaminantes han sido eliminados, que el material de prueba es comparable en todo el desarrollo, que el cumplimiento de las BPL se mantiene.

La farmacocinética (PK) de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente puede ser estudiada en una variedad de sistemas de animales, siendo el más relevante de primates no humanos tales como los monos cynomolgus y rhesus. Administraciones únicas o repetidas por vía intravenosa/subcutánea de un intervalo de dosis mayor de 6000 veces (0.05 a 300 mg/kg) se pueden evaluar para la vida media (días o semanas) mediante el uso de la concentración y la depuración plasmática. El volumen de distribución en estado estacionario y el nivel de absorbancia sistémica también se pueden medir. Ejemplos de tales parámetros de medición generalmente incluyen la concentración plasmática máxima observada (C_{max}), el tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}), el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito [AUC (0-inf)] y aparente vida media de eliminación (T_{1/2}). Parámetros medidos adicionales podrían incluir análisis compartimental de los datos de concentración-tiempo obtenidos tras la administración intravenosa y la biodisponibilidad.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden conferir farmacocinéticas superiores a terapéuticos que contienen Fc en sistemas animales o en humanos. Por ejemplo, una unión aumentada a FcRn puede aumentar la vida media y la exposición de los fármacos que contienen Fc. Alternativamente, una unión disminuida a FcRn puede disminuir la

vida media y la exposición de los fármacos que contienen Fc en casos donde una exposición reducida es favorable tales como cuando tal fármaco tiene efectos secundarios.

5 Se conoce en la técnica que el conjunto de receptores Fc se expresa diferencialmente en varios tipos de células inmunes, así como también en diferentes tejidos. La distribución diferencial en los tejidos de receptores Fc puede en última instancia tener un impacto en las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente. Debido a que las moléculas de coacoplamiento de la presentación tienen afinidades variables por el conjunto de receptores Fc, la selección adicional de los polipéptidos para las propiedades PD y/o PK puede ser extremadamente útil para definir el balance óptimo de PD, PK, y eficacia terapéutica conferida por cada polipéptido candidato.

10 Los estudios farmacocinéticos pueden incluir, pero sin limitarse a, dirigirse a células específicas o el bloqueo de los mecanismos de señalización, medición de la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno etc. Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden dirigirse a poblaciones celulares efectoras particulares y de ese modo dirigir los fármacos que contienen Fc para inducir ciertas actividades para mejorar la potencia o aumentar la penetración en un compartimiento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad y localización de los neutrófilos puede dirigirse mediante una molécula de coacoplamiento que tiene como objetivo el FcγRIIIb. Tales efectos farmacodinámicos se pueden demostrar en modelos animales o en humanos.

20 Uso

Una vez elaboradas las moléculas de coacoplamiento como se describe en la presente encuentran uso en una variedad de métodos. Métodos adecuados incluyen poner en contacto una célula que coexpresa IgE y FcγRIIb con una molécula de coacoplamiento de forma tal que ambos IgE y FcγRIIb se unen por la molécula de coacoplamiento y la célula se inhibe. Por "inhibida" en este contexto se entiende que la molécula de coacoplamiento previene o reduce la activación y/o proliferación de células B IgE +.

25 Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden encontrar uso en una amplia variedad de productos. Adecuadamente una molécula de coacoplamiento descrita en la presente es un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación. Las moléculas de coacoplamiento pueden encontrar uso en una composición que es monoclonal o policlonal. Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se pueden usar para propósitos terapéuticos. Como se apreciará por los expertos en la técnica, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se pueden usar para cualquier propósito terapéutico para el cual se pueden usar anticuerpos y similares. Las moléculas de coacoplamiento se pueden administrar a un paciente para tratar trastornos que incluyen pero sin limitarse a enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades infecciosas y el cáncer.

30 Un "paciente" para los propósitos descritos en la presente incluye humanos y otros animales, por ejemplo, otros mamíferos. Así las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente tienen tanto aplicaciones en la terapia humana como en la veterinaria. El término "tratamiento" o "tratar" como se describe en la presente se entiende que incluye tratamiento terapéutico, así como profiláctico, o medidas supresoras para una enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, la administración exitosa de una molécula de coacoplamiento antes del inicio de una enfermedad resulta en el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de una molécula de coacoplamiento optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratar" además abarcan la administración de una inmunoglobulina después de la aparición de la enfermedad con el objetivo de erradicar enfermedad. La administración exitosa de un agente después del inicio y después de que se desarrollaron los síntomas clínicos, con una posible reducción de los síntomas clínicos y quizás una mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "en necesidad de tratamiento" incluyen mamíferos, que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno, que incluye aquellos en los que la enfermedad o trastorno debe prevenirse.

35 Adecuadamente, una molécula de coacoplamiento descrita en la presente se administra a un paciente que tiene una enfermedad que involucra la expresión inadecuada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance descrito en la presente esta pretende incluir enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes, debidas por ejemplo a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, localización de la proteína, modificaciones postraduccionales, estado conformacional, la presencia de una proteína mutante o patogénica, etc. Similarmente, la enfermedad o trastorno se puede caracterizar por moléculas alteradas que incluyen pero sin limitarse a polisacáridos y gangliósidos. Una sobreabundancia puede deberse a cualquier causa, que incluye pero sin limitarse a la sobreexpresión a nivel molecular, la aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción, o una actividad aumentada de una proteína con relación a lo normal, en esta definición están incluidas enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción de una proteína. Esta reducción

puede deberse a cualquier causa, que incluye sin limitarse a, la expresión reducida a nivel molecular, la aparición acortada o reducida en el sitio de acción, las formas mutantes de la proteína, o la actividad disminuida de la proteína en relación a lo normal. Tal sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse en relación a la expresión normal, aparición, o actividad de una proteína, y dicha medición puede jugar un papel importante en el desarrollo y/o prueba clínica de las inmunoglobulinas descritas en la presente.

En la presente se describen métodos novedosos para el tratamiento de trastornos mediados por IgE, por ejemplo, alergias alimentarias y ambientales y asma alérgica. En las modalidades preferidas, las enfermedades alérgicas que pueden tratarse por los productos y métodos de la invención incluyen el asma alérgica y atópica, dermatitis atópica y eccema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica y choque anafiláctico. Las alergias ambientales y alimentarias que pueden tratarse incluyen al ácaro del polvo, cucarachas, gatos y otros animales, el polen (que incluye la ambrosía, el césped de Bermuda, el cardo ruso, el roble, el centeno y otros), mohos y hongos (por ejemplo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* y otros), el látex, las picaduras de insectos (abejas, avispa, y otros), penicilina y otros fármacos, fresas y otras frutas y vegetales, cacahuetes, soja y otras legumbres, nueces y otras nueces de árbol, moluscos y otros mariscos, la leche y otros productos lácteos, el trigo y otros cereales, y huevos. De hecho, cualquier alérgeno alimentario, aeroalérgeno, alérgeno ocupacional, u otro alérgeno ambiental mediado por IgE puede tratarse por una cantidad terapéutica de los productos descritos en esta invención. Para ejemplos de alérgenos comunes, ver Arbes y otros, Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Clinical Gastroenterology* 116(2), 377-383 (2005).

Además se describen pruebas de diagnóstico para identificar pacientes con probabilidades de mostrar una respuesta clínica favorable a una molécula de coacoplamiento descrita en la presente, o con probabilidades de exhibir una respuesta significativamente mejor cuando se tratan con una molécula de coacoplamiento descrita en la presente en función contra una o más terapias usadas actualmente. Se puede usar cualquiera de un número de métodos conocidos en la técnica para determinar el poliformismo de FcγR en humanos. Más aun, se describen además pruebas de pronóstico que se realizan en muestras clínicas tales como sangre y muestras de tejidos. Tales pruebas pueden ensayar la actividad, independientemente del mecanismo. Tal información puede usarse para identificar a los pacientes para su inclusión o exclusión en los ensayos clínicos, o para informar las decisiones con respecto a las dosificaciones adecuadas y regímenes de tratamiento. Tal información puede usarse para seleccionar un fármaco que contiene una molécula de coacoplamiento particular que muestra una actividad superior en tal ensayo.

Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formulan una molécula de coacoplamiento descrita en la presente y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se preparan para almacenamiento por la mezcla de dicha inmunoglobulina que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, acetato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metilo o propilparabén; catacol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos) ; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; endulzantes y otros agentes saborizantes; rellenos tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes de unión; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEEN™, PLURONIC™ o polietilenglicol (PEG). En una modalidad, la composición farmacéutica que comprende las inmunoglobulinas descritas en la presente puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, lo que pretende incluir sales de adición tanto ácidas como básicas. "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de ninguna otra forma indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. "Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas a partir de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio,

5 hierro, zinc, cobre, manganeso aluminio y similares. Algunas modalidades incluyen al menos una de las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables orgánicas no tóxicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, y etanolamina. Las formulaciones para usar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

10 Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se pueden formular además como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula muy pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que es útil para suministrar un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan por métodos conocidos en la técnica. Los componentes del liposoma comúnmente se ordenan en una formación en bicapa, similar al arreglo lipídico de las membranas biológicas. Particularmente, los liposomas útiles se pueden generar por el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidil etanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrudidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

15 La molécula de coacoplamiento y otros agentes terapéuticamente activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen pero sin limitarse a técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo mediante el uso de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli-(metilmetacrilato)), sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina , microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), y macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed., 1980. Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico, y ProLease® (disponible comercialmente de Alkermes), que es un sistema de liberación basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli--DL-lactida-co-glicólido (PLG).

Administración

35 La administración de una composición farmacéutica que comprende una molécula de coacoplamiento descrita en la presente, por ejemplo, en la forma de una solución acuosa estéril, puede hacerse en una variedad de formas, que incluyen pero sin limitarse a oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, intranasalmente, intraóticamente, transdermalmente, tópicamente (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, parenteralmente, rectalmente, o intraocularmente. En algunos casos, por ejemplo para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la inmunoglobulina puede aplicarse directamente como una solución o un aerosol. Como se conoce en la técnica, la composición farmacéutica se puede formular en consecuencia en dependencia de la manera de introducción.

45 La administración subcutánea se puede usar en circunstancias donde el paciente puede autoadministrarse la composición farmacéutica. Muchas proteínas terapéuticas no son suficientemente potentes para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente efectiva en el máximo volumen aceptable para la administración subcutánea. Este problema se puede abordar en parte por el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina, y polisorbato. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser más susceptibles para la administración subcutánea debido a, por ejemplo, la potencia aumentada, vida media en suero mejorada, o solubilidad aumentada.

50 Como se conoce en la técnica, las proteínas terapéuticas se suministran frecuentemente por infusión IV o bolo. Los anticuerpos descritos en la presente pueden además suministrarse mediante el uso de tales métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con 0.9% cloruro de sodio como vehículo de infusión.

55 El suministro pulmonar puede lograrse mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de aerosolización. Por ejemplo, se pueden usar la tecnología inhalable AERx® comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de suministro pulmonar Inhance™ comercialmente disponible de Nektar Therapeutics. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser más susceptibles para el suministro intrapulmonar. FcRn está presente en el pulmón, y puede promover el transporte desde el pulmón hasta el flujo sanguíneo (por ejemplo Syntonix documento WO 04004798, Bitonti y otros (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8). En consecuencia, los anticuerpos que unen FcRn más

efectivamente en el pulmón o que se liberan más eficazmente en el flujo sanguíneo pueden tener biodisponibilidad mejorada después de la administración intrapulmonar. Los anticuerpos descritos en la presente pueden además ser más susceptibles para el suministro intrapulmonar debido, por ejemplo, a una solubilidad mejorada o el punto isoeléctrico alterado.

5 Además, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser más susceptibles para el suministro oral debido a, por ejemplo, una estabilidad mejorada a pH gástrico y una resistencia a la proteólisis aumentada. Además, FcRn parece expresarse en el epitelio intestinal de los adultos, por lo que los anticuerpos descritos en la presente con perfiles de interacción con FcRn mejorados pueden aumentar la biodisponibilidad después de una administración oral. El transporte de anticuerpos mediado por FcRn puede además ocurrir en otras membranas mucosas tales como aquellas en los tractos
10 gastrointestinal, respiratorio y genital.

Adicionalmente, cualquiera de un número de sistemas de liberación se conocen en la técnica y se pueden usar para administrar los anticuerpos descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (por ejemplo, microesferas PLA/PGA), y similares. Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o matriz tal como poliésteres, hidrogeles, poli(vinilalcohol), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como el Lupron Depot®, y ácido poli-D(-)-3-hidroxiburírico. Es además posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina descrita en la presente, por ejemplo por infección retroviral, inyección directa, o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular, u otros agentes de transfección. En todos los casos, los sistemas de liberación controlada se pueden usar para liberar la inmunoglobulina en o cerca del lugar de acción deseado.

Dosificación

25 Las cantidades de dosificación y frecuencia de administración, en una modalidad, se seleccionan para ser terapéuticamente o profilácticamente efectivas. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de la proteína, suministro sistémico contra localizado, y velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como también la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, interacciones del fármaco y la severidad de la afección, y serán comprobables con experimentación de rutina por aquellos con experiencia en la técnica.

30 La concentración de la molécula de coacoplamiento terapéuticamente activa en la formulación puede variar desde aproximadamente 0.1 a 100 % de peso. Adecuadamente, la concentración de la molécula de coacoplamiento está en el intervalo de 0.003 a 1.0 molar. Con el objetivo de tratar un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva de la inmunoglobulina descrita en la presente. Por "dosis terapéuticamente efectiva" en la presente se entiende una dosis que produce el efecto para el cual se administró. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será determinable por una persona con experiencia en la técnica mediante el uso de técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden estar en el intervalo de 0.0001 a 100 mg/kg de peso corporal o mayor, por ejemplo 0.1, 1, 10, o 50 mg/kg de peso corporal. En una modalidad, las dosificaciones están en el intervalo de 1 a 10 mg/kg.

40 Adecuadamente, solamente se usa una dosis única de la molécula de coacoplamiento. En otras modalidades, se administran múltiples dosis de la molécula de coacoplamiento. El tiempo transcurrido entre administraciones puede ser menor que 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, o más de 2 semanas.

45 Adecuadamente las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea por administración continua o administraciones frecuentes sin extender los períodos de descanso. Tal administración metronómica puede involucrar dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Típicamente tales regímenes abarcan bajas dosis crónicas o infusión continua por un período de tiempo extendido, por ejemplo 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses, o hasta 6 meses o más. El uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de descanso.

50 Adecuadamente las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. Las terapias cíclicas involucran la administración de un primer agente en un momento, un segundo agente en un segundo momento, opcionalmente agentes adicionales en momentos adicionales, opcionalmente un período de descanso, y después la repetición de esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos es típicamente de 2 - 10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios, o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

Terapias de combinación

5 Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se pueden administrar concomitantemente con uno o más regímenes terapéuticos o agentes. Regímenes terapéuticos o agentes adicionales se pueden usar para tratar la misma enfermedad, para tratar una complicación acompañante, o se pueden usar para mejorar la eficacia o seguridad de la inmunoglobulina.

10 Coterapias particularmente preferidas incluyen aquellas que están aprobadas o se evalúan clínicamente para el tratamiento de trastornos mediados por IgE tales como alergias y asma. En particular, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden usar en combinación con anti-inflamatorios tales como corticoides, y/o broncodilatadores tales como β 2-agonistas inhalados, los dos grupos principales de medicamentos. Los corticoesteroides inhalados incluyen fluticasona, budesonida, flunisolida, mometasona, triamcinolona, y beclometasona, mientras los corticoesteroides orales incluyen prednisona, metilprednisolona, y prednisolona. Otros esteroides incluyen glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, azulfidineicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos, así como esteroides tópicos tales como antralina, calcipotrieno, clobetasol, y tazaroteno. Los broncodilatadores aumentan el diámetro de las vías aéreas y facilitan el flujo hacia y desde los pulmones. Los broncodilatadores que pueden combinarse con las terapias de la invención incluyen broncodilatadores de acción corta tales como metaproterenol, efedrina, terbutalina, y albuterol, y bronco dilatadores de acción prolongada tales como salmeterol, metaproterenol, y teofilina.

20 Las terapias de la invención se pueden combinar con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) tales como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, ketoralaco, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, ketoprofeno, y nabumetona. Las coterapias pueden incluir antihistaminas tales como loratadina, fexofenadina, cetirizina, difenhidramina, maleato de clorfeniramina, clemastina, y azelastina. La coterapia puede incluir cromoglicato, cromolina de sodio, y nedrocromil, así como descongestionantes, aerosoles u orales, tales como oximetazolina, fenilefrina, y pseudoefedrina. Las terapias de la invención se pueden combinar con una clase de antiinflamatorios llamados antagonistas del receptor de leucotrieno tales como pranlukast, zafirlukast, y montelukast, e inhibidores de la síntesis del receptor de leucotrieno tales como zileuton.

30 Las terapias de la invención se pueden combinar con otras inmunoterapias, que incluyen inyecciones para la alergia, así como otros antagonistas de IgE o Fc ϵ Rs. Las terapias de la invención se pueden combinar con antagonistas o quemocinas o citocinas, que incluyen pero sin limitarse a fusiones de anticuerpos y Fc, que incluyen pero sin limitarse a inhibidores de las quemocinas CCR3, CCR4, CCR8, y CRTH2, y CCR5, e inhibidores de las citocinas IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-21, receptores de citocinas de la familia de clase II, IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31, e IL-33. Las terapias de la invención se pueden combinar con moduladores de adhesión, factores de transcripción, y/o señalización intracelular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la invención se pueden combinar con moduladores de NF- κ B, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFATs, supresores de la señalización de las citocinas (SOCS), los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPARs), MAP cinasa, p38 MAPK, JNK, y receptor de esfingosina 1-fosfato. Las terapias de la invención se pueden administrar con tociato de suplatast, inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE4), bloqueadores de los canales de calcio, y moléculas tipo heparina. Posibles coterapias para la invención se describen más aun en detalle en Caramori y otros, 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3-S1-S6.

45 Las terapias de la invención pueden usarse además en conjunto con uno o más antibióticos, agentes anti-fúngicos, o agentes anti-virales. Los anticuerpos descritos en la presente pueden además combinarse con otros regímenes terapéuticos tales como la cirugía.

Ejemplos

50 Los ejemplos que se proporcionan más abajo son solamente para propósitos ilustrativos. Estos ejemplos no pretenden restringir ninguna modalidad descrita en la presente a ninguna aplicación particular o teoría de operación.

Ejemplo 1. Métodos novedosos para inhibir células IgE+ Fc γ RIIb+

55 La inmunoglobulina IgE es un iniciador y propagador central de la respuesta alérgica en el tejido afectado. La IgE se une al receptor de alta afinidad para IgE (Fc ϵ RI), un receptor fundamental involucrado en las manifestaciones alérgicas inmediatas que se expresa en una variedad de células efectoras, que incluyen mastocitos, basófilos, eosinófilos, así como también de los tipos de células. La reticulación del Fc ϵ RI por inmuno complejos IgE-alergeno activa estas células, que liberan mediadores químicos tales como histamina, prostaglandinas, y leucotrienos, que pueden llevar al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo I. El anticuerpo monoclonal aprobado Omalizumab (Xolair) neutraliza la IgE por la unión a esta y

el bloqueo de la interacción con FcεR's. El Omalizumab reduce la IgE bioactiva mediante el secuestro, atenuando la cantidad de IgE específica por el antígeno que puede unirse y sensibilizar los mastocitos y basófilos de los tejidos. Esta neutralización de la IgE libre circulante, a cambio, lleva a una disminución de los síntomas de las enfermedades alérgicas. Interesantemente, los niveles de IgE del suero aumentan después del comienzo de la terapia debido a la formación de complejos omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. Consecuentemente, este problema puede llevar a falsos negativos en pruebas de diagnóstico y por lo tanto los niveles de IgG deben comprobarse rutinariamente.

Un enfoque novedoso dirigido a la ruta de la IgE involucra no solo bloquear la interacción de la IgE libre circulante con el FcεRs sobre las células efectoras, sino dirigirse a la fuente de producción de IgE. La IgE se secreta por las células plasmáticas productoras de IgE localizadas en los nódulos linfáticos que drenan el sitio de entrada o localmente en los sitios de las reacciones alérgicas. Las células plasmáticas productoras de IgE se diferencian a partir de células B IgE+. El cambio de clase de las células B para la producción de IgE se induce por dos señales separadas, ambas pueden proporcionarse por las células TH2.

Hay dos formas de inmunoglobulinas: la forma secretada y la anclada a la membrana. La forma anclada a la membrana se diferencia de la forma secretada en que la primera tiene un péptido de anclaje a la membrana que se extiende a partir del C terminal de la cadena pesada. La inmunoglobulina anclada a la membrana en las células B, además referida como complejo receptor de célula B (BCR), es crítica para las funciones de la célula B. Este puede transducir señales para las células B en reposo para diferenciarse en linfoblastos activados y células plasmáticas secretoras de Ig.

Las células B diferenciadas que expresan IgE anclada a la membrana, referidas aquí como células B mIgE+, poseen un mecanismo de retroalimentación de regulación negativa natural - el receptor FcγRIIb inhibidor de Fc. El FcγRIIb se expresa en una variedad de células inmunes que incluyen células B, células dendríticas, monocitos, y macrófagos, donde juega un papel crítico en la regulación inmune. En su papel normal en las células B, el FcγRIIb sirve como un mecanismo de retroalimentación para modular la activación de la célula B a través del receptor de la célula B (BCR). La interacción del BCR con un antígeno en un inmuno complejo sobre las células B maduras activa una cascada de señalización intracelular, que incluye la movilización de calcio, que lleva a la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, como se producen anticuerpos IgG con especificidad por el antígeno los inmuno complejos asociados (ICs) pueden reticular el BCR con el FcγRIIb, después de lo cual la activación del BCR se inhibe por la interacción del FcγRIIb y las vías de señalización intracelulares asociadas que interfieren con las vías corriente abajo de activación del BCR. La expresión de FcγRIIb en la superficie de las células B mIgE+, que usan la mIgE como su BCR, sirve como un regulador negativo de este tipo de célula.

Una estrategia novedosa para inhibir enfermedades mediadas por IgE, ilustradas en la Figura 1, es inhibir las células B IgE+ (es decir las células B que expresan la IgE anclada a la membrana) por la coocoplamiento con la IgE anclada a la membrana y el receptor inhibidor FcγRIIb. En las células B que cambiaron de clase para expresar IgE, la mIgE sirve como BCR (referidas en la presente como mIgE BCR). Este acercamiento podría potencialmente imitar el mecanismo biológico natural de supresión de activación de células B mediado por inmunocomplejos, previniendo de ese modo la diferenciación a células plasmáticas productoras de IgE. Las células plasmáticas productoras de IgE residen en la médula ósea y probablemente tienen una vida útil de varias semanas a varios meses. Dado que las nuevas células plasmáticas secretoras de IgE pasan por etapas de célula B que expresan mIgE durante su diferenciación, si su generación se abroga por la inhibición de sus precursores de células B mIgE+ con este tratamiento anti-IgE, las células plasmáticas existentes morirán en semanas a meses, y así la producción de IgE gradualmente se suprimirá. Importantly, la inhibición de las células B de memoria IgE+, que portan mIgE, podría además inhibirse por inmunoglobulinas anti-IgE que cointeraccionan con el FcγRIIb con alta afinidad. Si esto ocurre, la terapia puede tener un impacto a largo plazo sobre la enfermedad fundamental.

Ejemplo 2. Anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb

Bajo condiciones fisiológicas, enlazar el BCR con el FcγRIIb y la supresión consecuente de la célula B ocurre a través de inmunocomplejos de IgGs y el antígeno cognado. La estrategia diseñada fue reproducir este efecto mediante el uso de un único anticuerpo de reticulación. La IgG humana se une al FcγRIIb humano con afinidad débil (mayor que 100 nM para IgG1), y la inhibición mediada por el FcγRIIb ocurre en respuesta a la IgG en inmunocomplejos pero no a la monomérica. Se razonó que se requiere una alta afinidad por este receptor (menor que 100 nM) para una máxima inhibición de la activación de la célula B. Con el objetivo de aumentar la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE de la invención, la región Fc se diseñó mediante ingeniería genética con variantes que mejoran la unión al FcγRIIb. Se describió que las variantes de Fc diseñadas mediante ingeniería genética se unen al FcγRIIb con una afinidad mejorada en relación a la IgG1 nativa (USSN 12/156, 183 (Estados Unidos 2009-0136485 A1) presentado el 30 de mayo de 2008, titulado "Methods and Compositions for inhibiting CD32b Expressing cells").

Las variantes se generaron originalmente en el contexto de un anticuerpo dirigido al antígeno CD19, un componente regulatorio del complejo correceptor del BCR. La región Fv de este anticuerpo es una versión humanizada y con afinidad madurada del anticuerpo 4G7, y denominada en la presente como HuAM4G7. Los genes Fv para este anticuerpo se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 (Consejo de Investigación Nacional de Canadá). Las mutaciones en el dominio Fc se introdujeron mediante el uso de mutagénesis dirigida (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, TX). Adicionalmente, se generaron variantes de control knock out con ablación de sus afinidades por receptores Fc que comprenden las sustituciones G236R y L328R (G236R/L328R). Esta variante se refiere Fc-KO o Fc knockout. Las construcciones de cadena ligera y pesada se cotransfectaron en células HEK293E para su expresión, y los anticuerpos se purificaron mediante el uso de cromatografía de afinidad de proteína A (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

La proteína recombinante humana FcγRIIb para los estudios de unión se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los genes que codifican las proteínas de los receptores FcγRIIIa y FcγRIIIa se obtuvieron de la Colección de Genes de Mamíferos (ATCC), y se subclonaron en el vector pTT5 (Consejo de Investigación Nacional de Canadá) que contiene etiquetas 6X His. Las formas alélicas de los receptores (H131 y R131 para FcγRIIIa y V158 y F158 para FcγRIIIa) se generaron mediante el uso de mutagénesis por QuikChange. Los vectores que codifican los receptores se transfectaron en células HEK293T, y las proteínas se purificaron mediante el uso de cromatografía de afinidad de níquel.

Las variantes se probaron para afinidad por el receptor mediante el uso de la tecnología Biacore, además referida como Biacore en la presente, una tecnología basada en resonancia de plasmones de superficie (SPR) para el estudio de las interacciones moleculares en tiempo real. Las mediciones de SPR se realizaron mediante el uso de un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Un chip de proteína A/G (Pierce Biotechnology) biosensor CM5 (Biacore) se generó mediante el uso de un protocolo de acoplamiento de amina primaria estándar. Todas las mediciones se realizaron mediante el uso de amortiguador HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% vol/vol surfactante P20, Biacore). Los anticuerpos a 20 nM o 50 nM en amortiguador HBS-EP se inmovilizaron sobre la superficie de proteína A/G y se inyectaron FcγRs. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró por la inyección de amortiguador glicina (10 mM, pH 1.5). Los datos se procesaron por reducción a cero del tiempo y la respuesta antes de la inyección de FcγR y por la sustracción de señales inespecíficas adecuadas (respuesta del canal de referencia e inyección del amortiguador de corrida). El análisis cinético se realizó por el ajuste global de los datos de unión con un modelo de unión Langmuir 1:1 mediante el uso del programa informático BIAevaluation (Biacore).

Un conjunto representativo de sensogramas para la unión de variantes selectas de anticuerpos anti-CD19 al FcγRIIb se muestra en la Figura 2. Las afinidades de todas las IgG1 variantes y WT (nativas) por todos los FcγRs, obtenidas a partir de ajustes de los datos de unión de Biacore, se grafican en la Figura 3 y se proporcionan numéricamente en la Figura 4. Mientras la IgG1 WT Fc se une con el FcγRIIb con afinidad μM ($K_D = 1.8 \mu\text{M}$ en la Figura 4), un número de variantes, por ejemplo G236D/S267E, S239D/S267E, y S267E/L328F, se diseñó mediante ingeniería genética para unir el receptor inhibitor más fuertemente. La variante S239D/I332E como se describe en USSN 11/124,620 (Estados Unidos 2006-0024298 A1) además tiene afinidad mejorada por los receptores activadores FcγRIIIa y FcγRIIIa, y por lo tanto es capaz de mediar citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y fagocitosis (ADCP) aumentadas. La variante G236R/L328R, referida además como Fc-knockout o Fc-KO, carece de unión a los receptores Fc, y se usa como control en los experimentos descritos en la presente.

Las variantes seleccionadas se construyeron en anticuerpos dirigidos a IgE. Las regiones variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) de los anticuerpos anti-IgE se proporcionan en la Figura 5. Omalizumab es un anticuerpo humanizado que está actualmente aprobado para el tratamiento de asma alérgica, y se comercializa bajo el nombre de Xolair. MaE11 es el precursor murino de Omalizumab. H1L1_MaE11 es una versión humanizada novedosa de MaE11. Los genes que codifican los dominios de cadena pesada y ligera VH y VL de estos anticuerpos anti-IgE se sintetizaron comercialmente (Blue Heron Biotechnologies). Además se sintetizaron los genes de región variable VH y VL del anticuerpo motavizumab anti-virus sincitial respiratorio (RSV), usado en los experimentos descritos en la presente como un control negativo. Los genes VL se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 (NRC-BRI, Canadá) que codifica la cadena constante C kappa. Los genes VH se subclonaron en el vector pTT5 que codifica la IgG1 nativa y las cadenas pesadas de las variantes. Las secuencias de amino ácidos de las cadenas constantes seleccionadas se proporcionan en la Figura 6. Todo el ADN se secuenció para confirmar la fidelidad de las secuencias. Las secuencias de amino ácidos de las cadenas pesada y ligera en toda su extensión de los anticuerpos seleccionados se proporciona en la Figura 7.

Los plásmidos que contienen genes de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK293E mediante el uso de lipofectamina (Invitrogen) y se cultivaron en medio FreeStyle 293 (Invitrogen). Después de 5 días de cultivo, los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante de cultivo por afinidad en proteína A mediante el uso de resina MabSelect (GE Healthcare).

Los anticuerpos IgG1 anti-IgE variante y nativo se probaron para la unión a IgE y a FcγRIIb mediante el uso de Biacore. El ADN que codifica la región Fc de la IgE, que contiene el sitio de unión para los anticuerpos anti-IgE usados, se sintetizó (Blue Heron Biotechnologies) y subclonó en el vector pTT5. La Fc de IgE se expresó en células 293E y se purificó mediante el uso de proteína A como se describió anteriormente. Las mediciones de SPR se realizaron mediante el uso del método de captura proteína A / anticuerpo descrito anteriormente, excepto que el analito fue FcγRIIb o la región Fc de IgE. La captación de los datos y el ajuste son como se describió anteriormente. La Figura 8 proporciona la constante de equilibrio de unión resultante (K_D s) obtenida a partir de estos experimentos de unión, así como veces la afinidad de unión al FcγRIIb en relación a la IgG1 nativa. La Figura 9 muestra los gráficos de estos datos. Los resultados confirman la altura de la afinidad de los anticuerpos por la IgE, y que la variante S267E/L328F mejora la unión a FcγRIIb sobre dos órdenes de magnitud, consistente con resultados previos.

El uso de las variantes particulares, por ejemplo S267E/L328F y S239D/I332E, se entienden aquí como una prueba de concepto para el mecanismo como se describe en la presente, y no se pretende que limiten la invención a su uso particular. Los datos proporcionados en USSN 12/156,183 y USSN 11/124,620 indican que un número de variantes diseñadas mediante ingeniería genética, en posiciones específicas del Fc, proporcionan las propiedades objetivo. Las sustituciones para mejorar la afinidad con el FcγR, en particular con el FcγRIIb, incluyen: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, y 332. Adecuadamente, se hacen sustituciones a al menos una o más de las siguientes posiciones no limitantes para mejorar la afinidad con el FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268, y 328.

Las combinaciones no limitantes de posiciones para hacer sustituciones que mejoren la afinidad con el FcγRIIb incluyen: 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328, y 328/332. Adecuadamente, las combinaciones de posiciones para hacer sustituciones que mejoren la afinidad con el FcγRIIb incluyen, pero sin limitarse a: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268, y 267/328.

Las sustituciones para mejorar la afinidad con el FcγRIIb incluyen: 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E. Adecuadamente, la combinación de posiciones para hacer que las sustituciones mejoren la afinidad con el FcγRIIb incluyen, pero sin limitarse a: 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, y 328Y.

Las combinaciones de las sustituciones para mejorar la afinidad con el FcγRIIb incluyen: L234D/S267E, L234E/S267E, L234F/S267E, L234E/L328F, L234W/S239D, L234W/S239E, L234W/S267E, L234W/L328Y, L235D/S267E, L235D/L328F, L235F/S239D, L235F/S267E, L235F/L328Y, L235Y/G236D, L235Y/S239D, L235Y/S267D, L235Y/S267E, L235Y/H268E, L235Y/L328F, G236D/S239D, G236D/S267E, G236D/H268E, G236D/L328F, G236N/S267E, G237D/S267E, G237N/S267E, S239D/S267D, S239D/S267E, S239D/H268D, S239D/H268E, S239D/A327D, S239D/L328F, S239D/L328W, S239D/L328Y, S239D/I332E, S239E/S267E, V266M/S267E, S267D/H268E, S267E/H268D, S267E/H268E, S267E/N325L, S267E/A327D, S267E/A327E, S267E/L328F, S267E/L328I, S267E/L328Y, S267E/I332E, H268D/A327D, H268D/L328F, H268D/L328W, H268D/L328Y, H268D/I332E, H268E/L328F, H268E/L328Y, A327D/L328Y, L328F/I332E, L328W/I332E, y L328Y/I332E. Adecuadamente, las combinaciones de las sustituciones para mejorar la afinidad con el FcγRIIb incluyen, pero sin limitarse a: L235Y/S267E, G236D/S267E, S239D/H268D, S239D/S267E, S267E/H268D, S267E/H268E, y S267E/L328F.

Ejemplo 3. Inhibición in vitro de células B IgE+ por anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por el FcγRIIb

Se estableció un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para detectar la IgE. Placas de fondo plano se prepararon por recubrimiento con amortiguador NaBicarbonato pH 9.4, seguido por adherencia con anticuerpos de captura anti-IgE a 10 ug/ml durante la noche en pH 9.4 (amortiguador NaBicarbonato 0.1 M). Después de la noche, las placas se bloquearon con 3%BSA/PBS, y se añadieron diluciones seriadas de IgE (del kit de ELISA para IgE humana, Bethyl Laboratories) 3x a 1 ug/ml. Después de 3 horas, las placas se lavaron 3x (200 ul) con TTBS, y se midió la IgE unida. Se añadió el anticuerpo anti-IgE humana policlonal de carnero conjugado a HRP (Bethyl Laboratories) a (1:5000) por 1 hora en 1%BSA/PBS. Las muestras se lavaron 3x y la IgE se detectó con el sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Inc 50-76-00). Las reacciones se detuvieron con 50 ul 2N H2SO4 y se leyeron a 450 nm.

La Figura 10 muestra la IgE capturada con varios anticuerpos anti-IgE humanos, lo que incluye un conjunto de tres anticuerpos monoclonales anti-IgE (MabTech; 107/182/101), MaE11_IgG1_G236R/L328R, y Omalizumab_IgG1_G236R/L328R. Los datos muestran que el reactivo anticuerpo anti IgE comercial (MabTech), Omalizumab, y su anticuerpo quimérico parental MaE11 son capaces de capturar la IgE. Con el objetivo de usar este ensayo para detectar la IgE, fue necesario determinar si los anticuerpos MaE11 y omalizumab interferirían con la captura de IgE por el reactivo anti-IgE de MabTech. El ensayo se repitió como se describió anteriormente, y la concentración de IgE a

partir de la absorbancia se calculó mediante el uso de una curva estándar. La Figura 11 muestra que el anticuerpo anti-IgE omalizumab_G236R/L328R no compete con el anticuerpo anti-IgE de MabTech en el protocolo de ELISA actual.

5 Los anticuerpos anti-IgG de Fc variantes se probaron para su capacidad de inhibir células B IgE+. Las PBMCs humanas se indujeron a cambiar de clase a células B productoras de IgE por la adición de 5 ng/ml interleucina-4 (IL-4) y 100 ng/ml de anticuerpo anti-CD40 (clon G28.5 IgG1). El anticuerpo anti-CD40 es un agonista de CD40, y así imita la actividad de coactivador de CD40L. Se añadieron concentraciones variantes de anticuerpos anti-IgE, y las muestras se incubaron por 12 días. Las placas de ELISA se prepararon y bloquearon como se describió anteriormente, mediante el uso de 5 ug/ml de anticuerpo de captura anti-IgE de Mabtech. 100 ul de las muestras de PBMC se añadieron e incubaron >3 horas, y después se lavaron con TTBS 3x (200 ul). El anticuerpo conjugado a anticuerpo-HRP se añadió y se detectó como se describió anteriormente. La absorbancia a 450 nm se convirtió a concentración de IgE mediante el uso de una curva estándar. Los resultados se muestran en la Figura 12. Los anticuerpos que carecen de unión a FcγR (las variantes G236R/L328R) o que no tienen especificidad por IgE (anticuerpo anti-RSV Motavizumab) no tuvieron efecto sobre la producción de IgE por las células B diferenciadas. En contraste, las variantes de anticuerpos con mayor afinidad por el FcγRIIb inhibieron la producción de IgE. Estos datos sugieren que la co-interacción con la IgE de superficie y el receptor inhibitorio FcγR FcγRIIb inhibe las células B que cambiaron de clase de ese tipo de inmunoglobulina. La inhibición de las células B IgE+ reduce el número de células plasmáticas que expresan IgE, lo que en cambio reduce la cantidad de IgE detectada. Para evaluar la selectividad de esta actividad para las células B que producen IgE, se midió la IgG2 humana de las mismas muestras mediante el uso de un ELISA de IgG2 (Bethyl Laboratories). La Figura 13 muestra que la secreción de IgG2 no se inhibió, lo que indica que la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb es selectiva para las células con cambio de clase a IgE+. La repetición de este experimento mediante el uso de versiones variantes del anticuerpo aprobado anti-IgE Omalizumab mostraron resultados inhibitorios similares por la variante con alta afinidad por FcγRIIb (Figura 14).

25 La capacidad de los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb para inhibir la producción de IgE se evaluó en presencia de estimulación de la mlgE BCR. El ensayo anterior se repitió, con cambio de clase a IgE promovida por IL-4 y el anticuerpo agonista α-CD40, y adicionalmente las células B se activaron mediante el uso ya sea de anticuerpos anti-μ o anti-CD79b. Estos anticuerpos reticulan el BCR, de ese modo proporcionan una señal similar al antígeno en inmunocomplejo. Los anticuerpos anti-μ reticulan la IgM anclada a la membrana, y los anti-CD79b reticulan CD79b, que es un componente de la señalización del complejo del BCR. Las PBMCs se incubaron por 14 días con IL-4, α-CD40, y ya sea anti-CD79b o anti-μ, y se detectó la IgE como se describió anteriormente. Los resultados para anti-CD79b (Figura 15) y anti-μ (Figura 16) muestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por el FcγRIIb son capaces de inhibir la producción de IgE cuando las células B se estimulan a través la reticulación del BCR.

35 Una estrategia adicional para inhibir las células B IgE+ es eliminarlas. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un anticuerpo anti-IgE que mejorado para la función efectora. La variante S239D/I332E aumenta la unión a los receptores activadores FcγRIIa y FcγRIIIa (Figura 3 y Figura 4), y así mejora las funciones efectoras ADCC y ADCP. En ensayo celular anterior se llevó a cabo mediante el uso de la variante S239D/I332E del anticuerpo anti-IgE Omalizumab. Las PBMCs se incubaron por 14 días con IL-4, α-CD40, y ya sea anti-CD79b (Figura 17) o anti-μ (Figura 18), y la IgE se detectó como se describió anteriormente. Los resultados (Figuras 17 y 18) muestran que los anticuerpos anti-IgE de células B IgE+ con función efectora optimizada son capaces de inhibir la producción de IgE de las células B IgE+ que cambiaron de clase.

Ejemplo 4. Inhibición in vivo de células B IgE+ por anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb

45 Las inmunoglobulinas descritas en la presente se ensayaron mediante el uso de un modelo de ratón huPBL-SCID como una aproximación para la actividad terapéutica en humanos. Este estudio examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IgE descritos aquí para inhibir la actividad de células B y el desarrollo de células plasmáticas en respuesta a un alérgeno humano común - la proteína Der p 1 del ácaro del polvo. En este método, leucocitos de sangre periférica humana (PBLs) de sangre de un donante con respuesta alérgica a Der p 1 se implantaron en ratones SCID inmunodeficientes y se trataron con anticuerpos anti-IgE nativos o variantes. Los ratones se retaron con un antígeno para estimular una respuesta inmune, y se midió la producción de inmunoglobulinas para examinar el curso de desarrollo de las células B a células plasmáticas.

55 Los donantes de sangre se seleccionaron por alergia al antígeno del ácaro del polvo en base a la presencia de anticuerpos anti-IgE contra Der p 1. A un donante con reactividad positiva se le realizó una leucoféresis para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El protocolo para el estudio se proporciona en la Figura 20. Un día antes de la inyección de PBMC, a los ratones se les dieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) con 100 ul del anticuerpo anti-asialo GM (Wako, Richmond, VA) para eliminar las células asesinas naturales (NK) murinas. El siguiente día, los ratones se inyectaron i.p. con 3×10^7 PBLs en un volumen de 0.5 ml. Después de la inyección de PBMC, los ratones se asignaron a 5 grupos diferentes de ratones con 7 ratones en cada grupo. En el día 7 posterior a la inyección de PBMC, se recogió la

5 sangre de todos los ratones mediante la perforación del seno/plexo retro orbital (OSP) para la determinación de los niveles de IgG e IgE por ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dos días más tarde (día 9), los ratones se inyectaron i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. En el día 11, los ratones se inyectaron i.p. con 15 ug del antígeno Der p 1 del ácaro del polvo (LoTox Natural Der p1, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA). En el día 23 (12 días después de la vacunación del antígeno), se recogió la sangre de todos los ratones para la determinación de los anticuerpos IgG e IgE humanos. En el mismo día, los ratones recibieron una segunda inyección i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. Dos días más tarde (día 25), los ratones recibieron una vacunación de refuerzo i.p. de 10 ug de antígeno Der p 1 de ácaro del polvo. En el día 37 (12 días después del refuerzo con el antígeno), se recogió la sangre por OSP para la determinación de inmunoglobulinas humanas. Las concentraciones de IgG e IgE humanas se midieron mediante el uso de un método de ELISA similar a aquellos descritos anteriormente.

10 Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21 para los niveles en suero de IgG e IgE respectivamente. Antes del reto con el alérgeno, los niveles de anticuerpos IgG e IgE humanos eran bajos en todos los grupos. Después de la inmunización con Der p 1, todos los grupos mostraron altos niveles de IgG humana, lo que indicó una respuesta inmune robusta por las células B humanas implantadas ya sea contra el antígeno Der p 1 vacunado o antígenos de ratón endógenos. En contraste a la respuesta de IgG, los grupos de tratamiento se diferenciaron significativamente en su producción de anticuerpos IgE. Omalizumab y la versión IgG1 de H1L1 MaE11 fueron equivalentes al vehículo en su capacidad de inhibir la producción de IgE humana. Sin embargo la versión FcγRIIb-mejorada (IIbE, S267E/L328F) de H1L1 MaE11 no mostró niveles detectables de IgE humana. La variante Fc-KO (variante G236R/L328R) versión de H1L1 MaE11, que carece de unión a todos los FcγRs, mostró un aumento en la producción de IgE humana. Esto es posiblemente debido a su habilidad para reticular la mIgE de membrana y así activar células B IgE+, a pesar de su completa falta de actividad inhibitoria de FcγRIIb o citotóxica FcγRIIa/IIIa tales como aquellas que poseen la versiones IgG1 y IIbE del anticuerpo. Estos datos in vivo muestran que anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb son capaces de inhibir la activación de células B IgE+ humanas y la diferenciación a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, y así soportan el potencial de las inmunoglobulinas descritas en la presente para tratar trastornos mediados por IgE.

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo que comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a la membrana y en donde dicha región Fc es una variante de región Fc que comprende al menos la modificación de un aminoácido en comparación a la región Fc parental y en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste de S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, S239D/S267E, y S239D/I332E, de acuerdo al índice de la EU y en donde la región Fc parental es una IgG humana.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la región Fc parental es una IgG1 humana.
3. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha modificación comprende S267E.
- 15 4. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha modificación comprende S267E/L328F.
5. El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha modificación comprende S239D/I332E.
- 20 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicha región variable comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3, en donde VH CDR1 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:2 y sec. con núm. de ident.:18; dicha VH CDR2 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:3 y sec. con núm. de ident.:19; y dicha VH CDR3 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:4 y sec. con núm. de ident.:20.
- 25 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha región variable comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3, en donde VL CDR1 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:6 y sec. con núm. de ident.:22; dicha VL CDR2 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.: 7 y sec. con núm. de ident.: 23; y dicha VL CDR3 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:8 y sec. con núm. de ident.: 24.
- 30 8. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de las reivindicaciones 1-7.
9. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 8.
- 35 10. Un método para producir el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.
- 40 11. Un anticuerpo para usar como un medicamento, dicho anticuerpo comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a la membrana y en donde dicha región Fc es una variante de región Fc que comprende al menos la modificación de un amino ácido en comparación a una región Fc parental y en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste de S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, S239D/S267E, y S239D/I332E, de acuerdo al índice EU y en donde la región Fc parental es una IgG humana.
- 45 12. El anticuerpo para usar de acuerdo a la reivindicación 11, en donde la región Fc parental es una IgG1 humana.
13. El anticuerpo para usar de acuerdo a la reivindicación 11 o 12, en donde dicha modificación comprende S267E/L328F.
- 50 14. El anticuerpo para usar de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde dicha región variable comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3, y en donde dicha VH CDR1 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:2 y sec. con núm. de ident.:18; dicha VH CDR2 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:3 y sec. con núm. de ident.:19; y dicha VH CDR3 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:4 y sec. con núm. de ident.:20.
- 55 15. El anticuerpo para usar de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde dicha región variable comprende seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs), VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3, y en donde dicha VL CDR1 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:6 y sec. con núm. de ident.:22; dicha VL CDR2 comprende una secuencia

de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.: 7 y sec. con núm. de ident.: 23; y dicha VL CDR3 comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada de sec. con núm. de ident.:8 y sec. con núm. de ident.: 24.

Figura 1

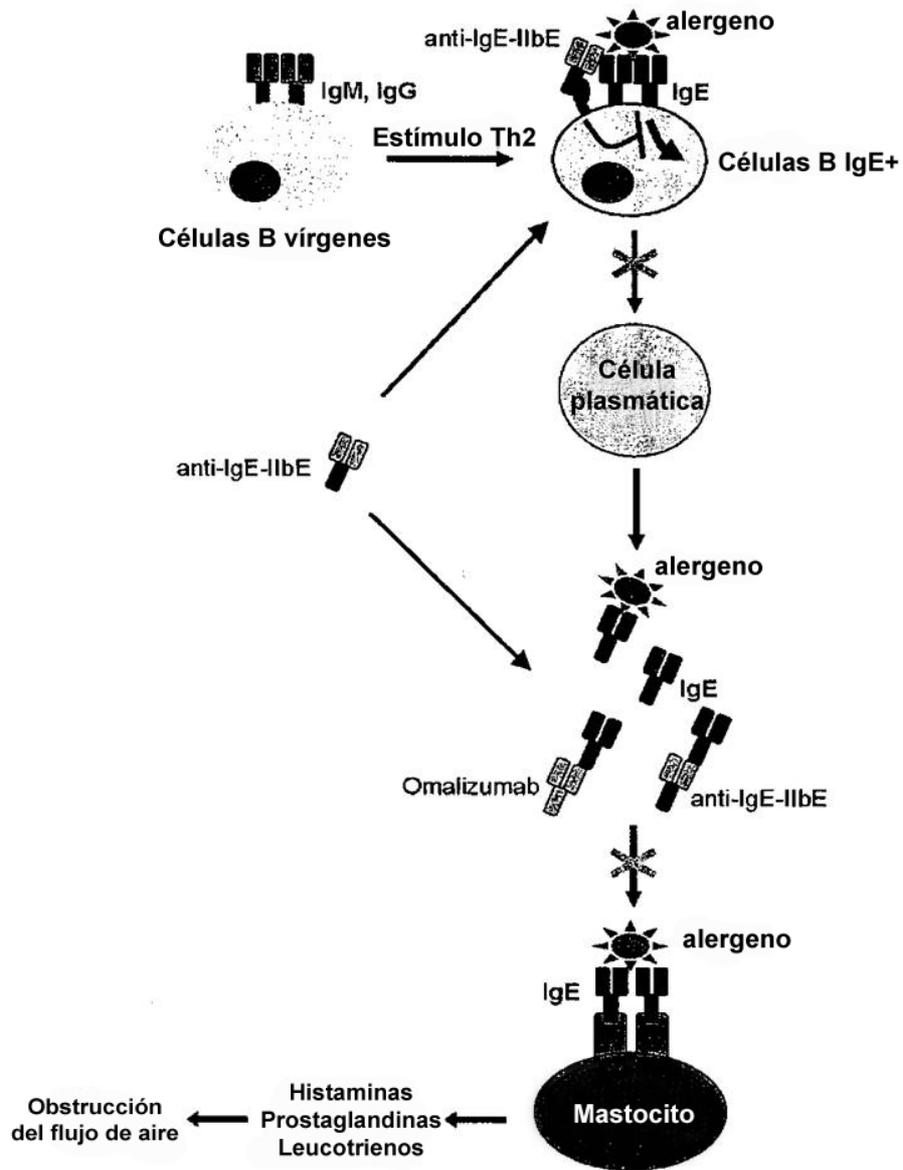


Figura 2

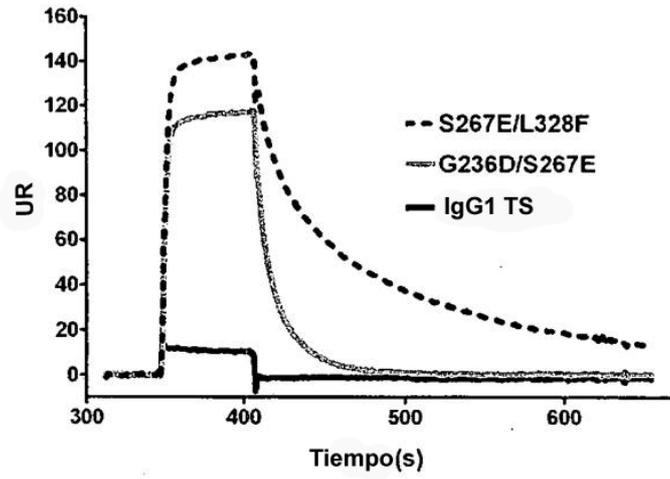


Figura 3

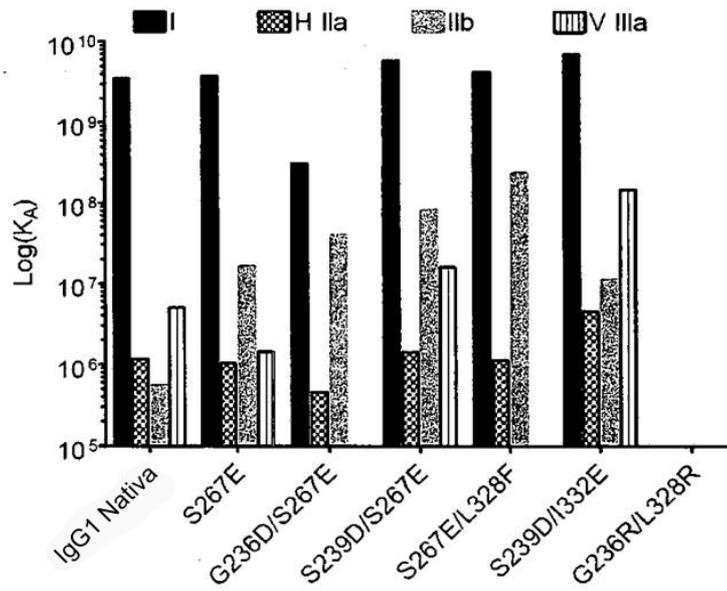


Figura 4

Anticuerpo	Fc γ RI		H131 Fc γ RIIIa		Fc γ RIIb		V158 Fc γ RIIIa	
	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces
IgG1 Nativa	2.8E-10	1.0	8.5E-07	1.0	1.8E-06	1.0	2.0E-07	1.0
S267E	2.6E-10	1.1	9.6E-07	0.89	6.0E-08	30	6.9E-07	0.29
G236D/S267E	3.2E-09	0.088	2.2E-06	0.39	2.5E-08	72	n.d.	
S239D/S267E	1.7E-10	1.6	7.0E-07	1.2	1.2E-08	150	6.2E-08	3
S267E/L328F	2.3E-10	1.2	8.8E-07	0.97	4.2E-09	429	n.d.	
S239D/I332E	1.4E-10	2.0	2.2E-07	3.9	8.8E-08	20	6.8E-09	29
G236R/L328R	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	

Figura 5

Omalizumab VH (SEC ID NUM:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTS
S

Omalizumab VH CDR1 (SEC ID NUM:2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEC ID NO:3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEC ID NUM:4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEQ ID NUM:5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
VPSRFGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEC ID NUM:6)

QSVDYDGDSY

Omalizumab VL CDR2 (SEC ID NUM:7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEC ID NUM:8)

SHEDPYT

MaE11 VH (SEC ID NUM:9)

DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNY
NPSLKNRISVTRDTSQNFLLKLNATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTS
S

MaE11 VH CDR1 (SEC ID NUM:10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEC ID NUM:11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEC ID NUM:12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEC ID NUM:13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLGSEI
PARFSGSGSGTDFLNIHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEC ID NUM:14)

QSVDYDGDSY

MaE11 VL CDR2 (SEC ID NUM:15)

AASYLGS

Figura 5 (contiuación)

MaE11 VL CDR3 (SEC ID NUM:16)

SHEDPYT

H1L1 MaE11 VH (SEC ID NUM:17)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWVWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTIS
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTSS

H1L1 MaE11 VH CDR1 (SEC ID NUM:18)

YSITSGYSW

H1L1 MaE11 VH CDR2 (SEC ID NUM:19)

TYDGS

H1L1 MaE11 VH CDR3 (SEC ID NUM:20)

GSHYFGHWHFVAV

H1L1 MaE11 VL (SEC ID NUM:21)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGDSYMNVWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

H1L1 MaE11 VL CDR1 (SEC ID NUM:22)

QSVDDYDGDY

H1L1 MaE11 VL CDR2 (SEC ID NUM:23)

AASYLGS

H1L1 MaE11 VL CDR3 (SEC ID NUM:24)

SHEDPYT

TES-21 VH (SEC ID NUM:25)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYTFSMYWLEWVVKRPGHGLEWVGEISPGTFTTN
YNEKFKAKATFTADTSSNTAYLQLSGLTSEDSAVYFCARFHFSGSNYDYFDYWGQGTSLT
VSS

TES-C21 VH CDR1 (SEC ID NUM:26)

YTFSMYW

TES-C21 VH CDR2 (SEC ID NUM:27)

SPGTFT

TES-C21 VH CDR3 (SEC ID NUM:28)

FSHFSGSNYDYFDY

TES-C21 VL (SEC ID NUM:29)

DILLTQSPAILSVPGERVFSFCRASQSIGTNIHWYQQRDGSPLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTEFTLNINSVESEDIADYYCQQSDSWPTTFGGGKLEIK

TES-C21 VL CDR1 (SEC ID NUM:30)

QSIGTN

Figura 5 (continuación)

TES-C21 VL CDR2 (SEC ID NUM:31)

YASESIS

TES-C21 VL CDR3 (SEC ID NUM:32)

SDSWPTT

Figura 6

Cadena ligera Ckappa (SEC ID NUM:33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena constante de la IgG1 nativa (SEC ID NUM:34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena constante de la IgG1 S267/L328F (SEC ID NUM:35)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena constante de la IgG1 G236D/S267E (SEC ID NUM:36)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

Cadena ligera del Omalizumab (VH-C κ) (SEC ID NUM:37)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
TLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada del Omalizumab IgG1 (SEC ID NUM:38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Cadena pesada del Omalizumab S267E/L328F (SEC ID NUM:39)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Cadena ligera del H1L1 MaE11 (VH-C κ) (SEC ID NUM:40)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSDVDYDGDSDYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada del H1L1 MaE11 IgG1 (SEC ID NUM:41)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKS
RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT
QKLSLSLSPGK

Cadena pesada del H1L1 MaE11 S267E/L328F)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKS
RVTISRDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT
QKLSLSLSPGK

Figura 8

Anticuerpo	IgE KD (M)	FcγRIIb KD (M)	FcγRIIb Veces
Omalizumab_IgG1_TS	2.2E-10	1.94E-06	1.0
Omalizumab_IgG1_S267E/L328F	2.0E-10	1.4E-08	135
MaE11_H1L1_IgG1_TS	6.1E-11	2.0E-06	1.0
MaE11_H1L1_IgG1_S267E/L328F	6.3E-11	5.6E-09	366
MaE11_H1L1_IgG1_G236R/L328R	6.4E-11	NB	

Figura 9

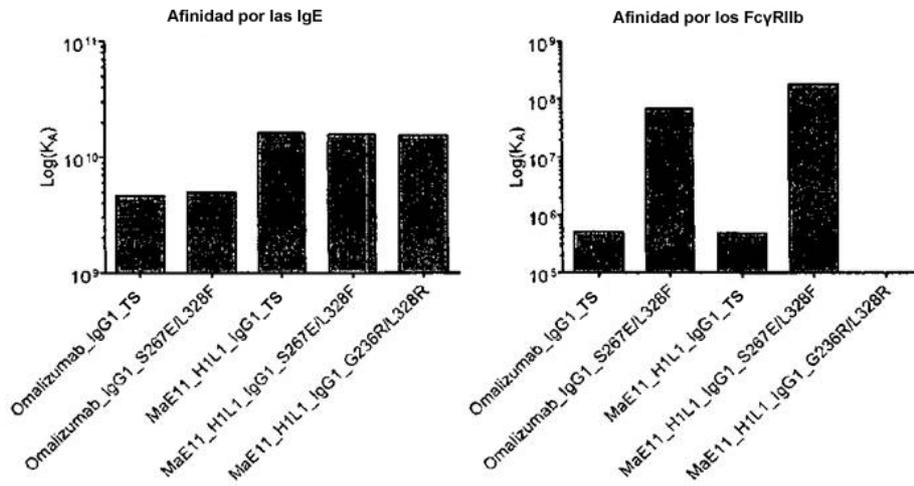


Figura 10

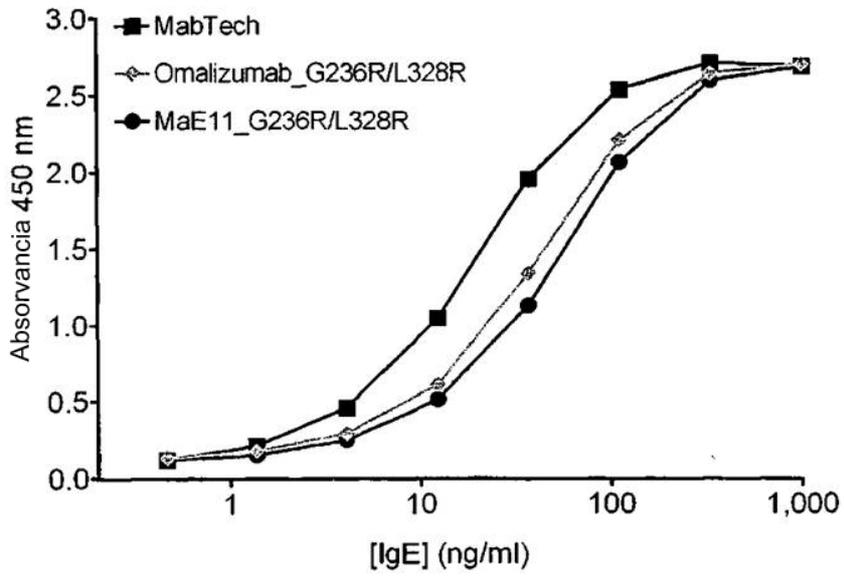


Figura 11

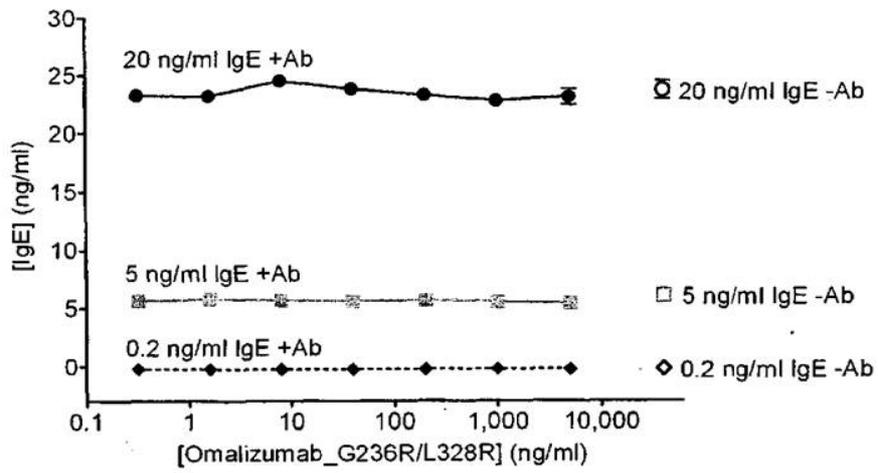


Figura 12

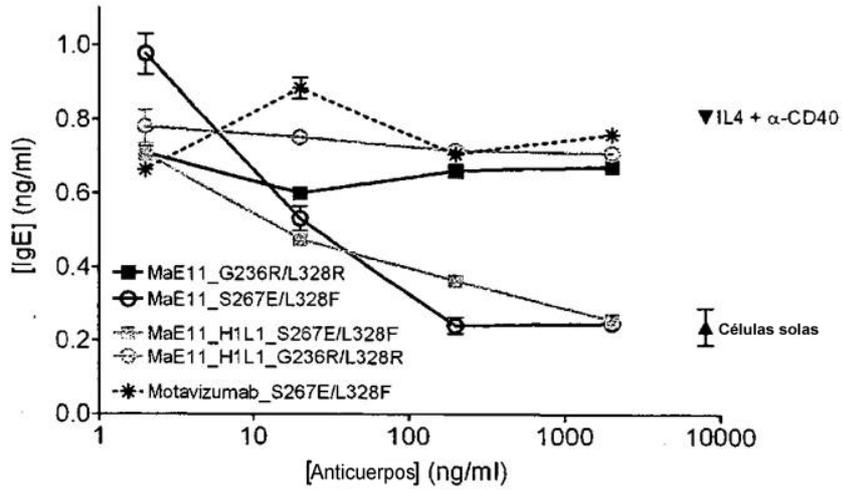


Figura 13

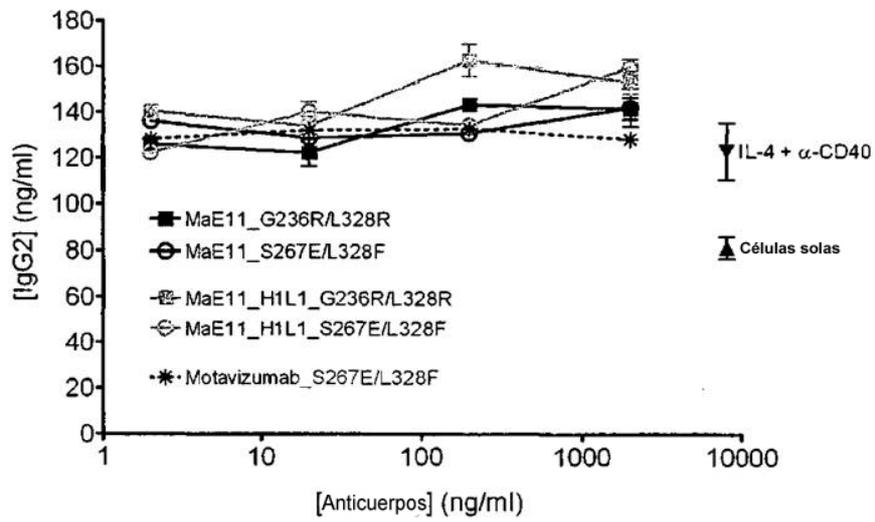


Figura 14

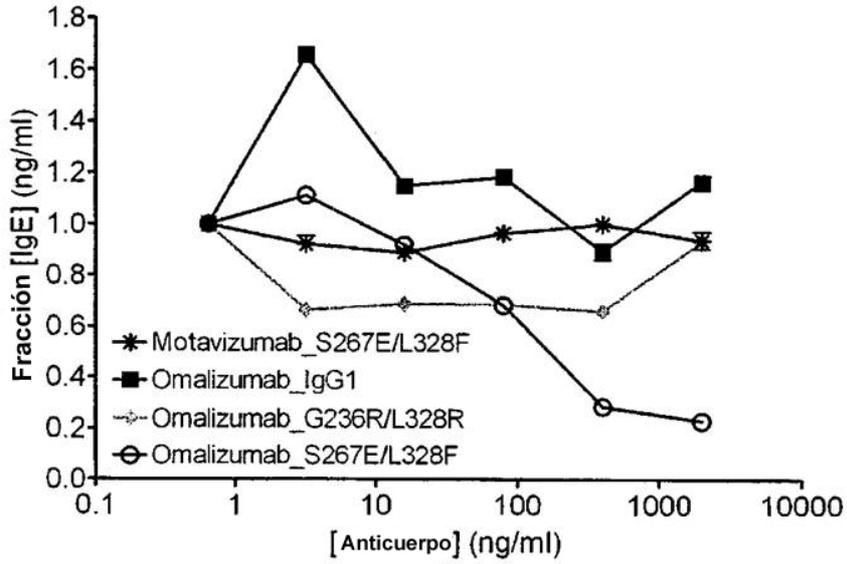


Figura 15

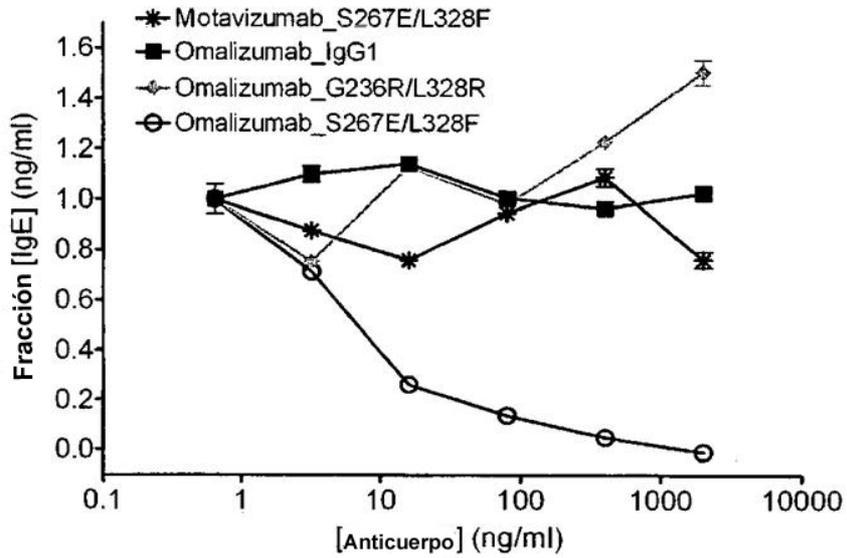


Figura 16

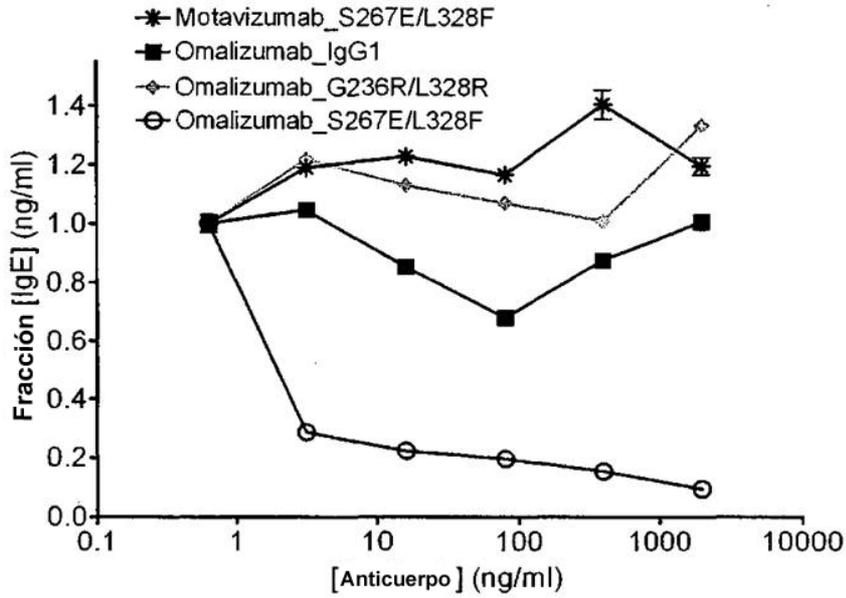


Figura 17

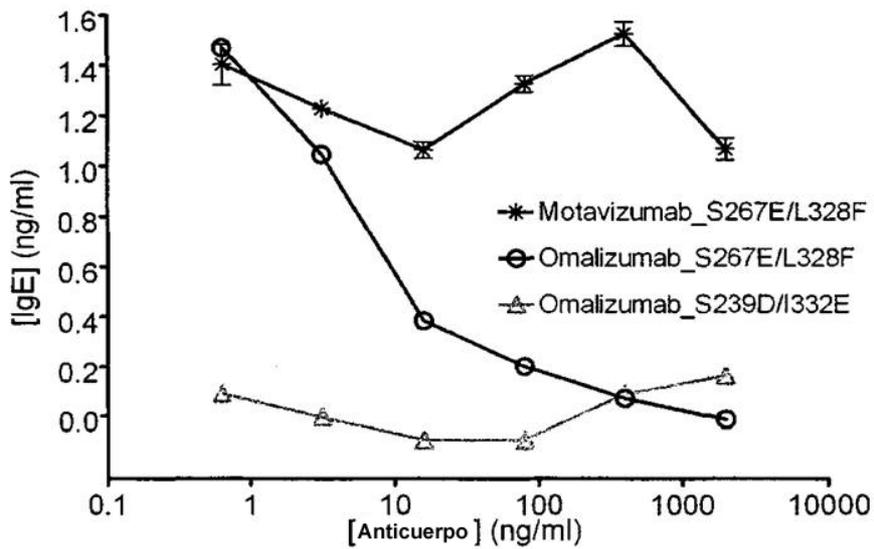


Figura 18

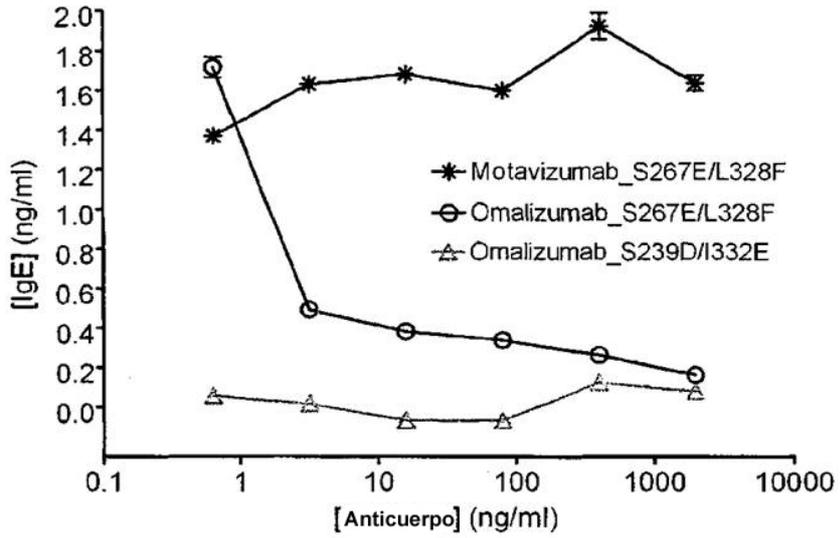


Figura 19

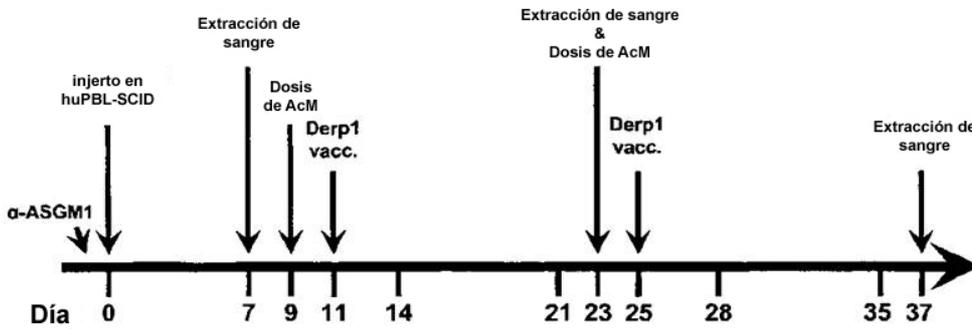


Figura 20

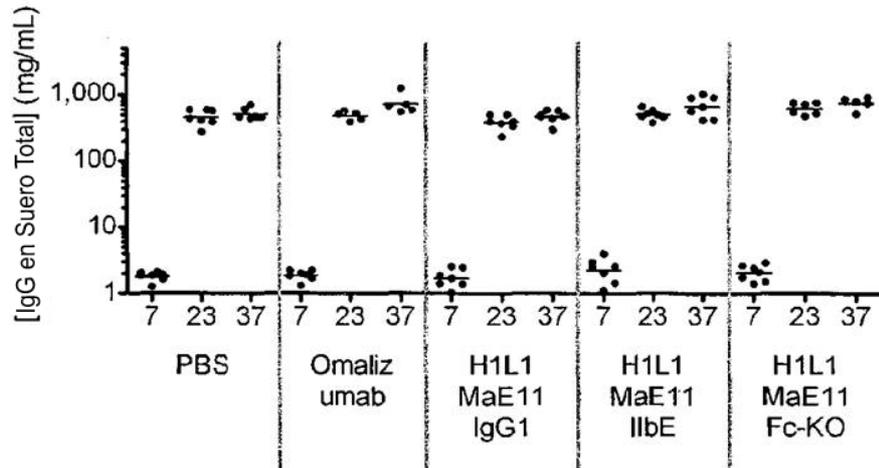


Figura 21

