

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 842**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 16170993 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 3190128**

54 Título: **Composiciones y métodos para para tratar trastornos mediados por IgE**

30 Prioridad:

17.09.2008 US 97819 P

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

11.04.2019

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:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 708 842 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

Composiciones y métodos para para tratar trastornos mediados por IgE

Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a composiciones de inmunoglobulina que unen IgE y FcγRIIb con alta afinidad, dichas composiciones pueden inhibir células que expresan IgE anclada a la membrana. Estas composiciones son útiles para tratar trastornos mediados por IgE, inclusive alergias y asma.

Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades y afecciones alérgicas, como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica y alergia a los alimentos, se han vuelto cada vez más prevalentes en las últimas décadas y ahora afectan al 10-40 % de la población en países industrializados. Las enfermedades alérgicas afectan profundamente la calidad de vida y pueden resultar en complicaciones graves, inclusive la muerte, como puede ocurrir en casos graves de asma y anafilaxis. Las alergias son dominantes y son la principal causa de tiempo perdido en el trabajo y la escuela y su impacto en la vida personal también, ya que sus costos directos e indirectos a los sistemas médicos y economías son enormes. Por ejemplo, la rinitis alérgica (fiebre del heno) afecta al 22 % o más de la población de EUA, mientras que se considera que el asma alérgica afecta al menos a 20 millones de residentes de EUA. Se ha estimado que el impacto económico de las enfermedades alérgicas en Estados Unidos, incluidos los costos de cuidado de salud y productividad perdida, asciende a \$6,4 mil millones a principios de los años 90 solo.

20 La mayoría de las enfermedades alérgicas es provocada por reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulina E (IgE). IgE es una clase de anticuerpo normalmente presente en el suero en concentraciones mínimas. Es producida por células plasmáticas que secretan IgE que expresan el anticuerpo en su superficie en determinada etapa de su maduración. Los pacientes alérgicos producen niveles elevados de IgE con especificidad de unión a antígenos generalmente inocuos a los que son sensibles. Estas moléculas de IgE circulan en la sangre y se unen a receptores específicos de IgE en la superficie de basófilos en la circulación y mastocitos a lo largo del revestimiento de la mucosa y por debajo de la piel. La unión del antígeno o alérgeno a IgE en mastocitos, basófilos y otros tipos celulares, reticula las moléculas de IgE y agrega los receptores subyacentes, impulsando así a las células a liberar mediadores estimuladores neuronales y vasoactivos como histaminas, leucotrienos, prostaglandinas, bradiquinina y factor de activación de plaquetas. La rápida reacción del sistema inmunológico a antígeno provocada por complejos inmunes de anticuerpo ha llevado al término reacción de hipersensibilidad inmediata o mediada por anticuerpo, en contraste a reacciones e hipersensibilidad retrasadas o mediadas por células que son mediadas por células T. Las reacciones inmunes mediadas por IgE se denominan específicamente reacciones de hipersensibilidad tipo I.

35 El receptor de alta afinidad para IgE (FcεRI) es un mediador clave para las manifestaciones alérgicas inmediatas. Además de los mastocitos y los basófilos, mediadores principales de las reacciones alérgicas, FcεRI se encuentra en una cantidad de otros tipos de células que incluye eosinófilos, plaquetas y en células presentadoras de antígenos como monocitos y células dendríticas. Un receptor adicional de IgE es FcεRII, también denominado CD23 o el receptor Fc de baja afinidad a IgE. FcεRII se expresa ampliamente en linfocitos B, macrófagos, plaquetas y muchos otros tipos celulares como músculo liso de las vías respiratorias. FcεRII puede tener una función en la regulación por retroalimentación de la expresión de IgE y posteriormente en la expresión superficial de FcεRII.

40 Debido a que la IgE juega un papel central en la mediación de la mayoría de las reacciones alérgicas, idear tratamientos para controlar los niveles de IgE en el cuerpo y regular la síntesis de IgE ha sido de gran interés. Se han propuesto varias estrategias para tratar las enfermedades alérgicas mediadas por IgE mediante la regulación por disminución de los niveles de IgE. Una estrategia implica neutralizar las moléculas de IgE mediante la unión de la cadena ε de IgE en el sitio de unión al receptor Fc, o cerca de este. Por ejemplo, Omalizumab (Xolair) es un anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado recombinante que se une a IgE en el mismo sitio Fc que FcεRI. Omalizumab provoca una reducción en la IgE circulante o en suero total en pacientes atópicos, lo cual atenúa la cantidad de IgE específica del antígeno que se puede unir y sensibilizar los mastocitos y basófilos. Esto, a su vez, lleva a una reducción de los síntomas de enfermedades alérgicas. Cabe destacar que los niveles de IgE en suero aumentan después del comienzo de la terapia debido a la formación del complejo de omalizumab e IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. Por consiguiente, este problema puede llevar a falsos negativos en pruebas de diagnóstico y por lo tanto los niveles de IgE se deben verificar de forma rutinaria. Por consiguiente, existe una necesidad de mejores métodos y composiciones para reducir las enfermedades y los síntomas de enfermedades mediadas por IgE.

55 US6037453 describe dos clases de polipéptidos derivados de IgE humana. WO 2004/065417 A2 describe métodos para producir anticuerpos humanizados y aumentar el rendimiento de los anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno cuando se producen en el cultivo celular. US6037453 y WO 2004/065417 A2 describen versiones humanizadas del anticuerpo anti-IgE de ratón MaE11. Chu et ál, Mol Immunol. setiembre de 2008;45(15):3926-33); La publicación electrónica del 8 de agosto de 2008 describe la inhibición de la activación mediada por receptores de células B de células B humanas principales por coadhesión de CD19 y FcγRIIb con anticuerpos modificados

genéticamente por Fc, por ejemplo, que comprende las sustituciones S267E y L328F.

Compendio de ejemplo de realizaciones

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo para usar en el tratamiento del asma alérgica en un sujeto que lo necesita, dicho anticuerpo comprende:

- 5 a. una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:42; y
- b. una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO:40.

En la presente se describen moléculas de cohesión novedosas que unen IgE y FcγRIIb con alta afinidad, composiciones que comprenden estas moléculas de cohesión y métodos para usar dichas moléculas de cohesión novedosas para tratar trastornos mediados por IgE. Las moléculas de cohesión descritas son capaces de inhibir las células que expresan IgE de membrana y FcγRIIb, es decir células IgE + FcγRIIb+. Las moléculas de cohesión descritas también son preferentemente capaces de unirse a IgE circulante. Los métodos de inhibición descritos en la presente comprenden poner en contacto las células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de cohesión que cohesiona IgE y FcγRIIb en la superficie de la célula.

Las composiciones descritas en la presente incluyen moléculas de cohesión capaces de cohesionar IgE y FcγRIIb con alta afinidad en la superficie celular. De manera adecuada, la molécula de cohesión incluye una inmunoglobulina que une IgE y FcγRIIb con alta afinidad. Las moléculas de cohesión descritas preferentemente cohesionan IgE y FcγRIIb anclados a la membrana en la superficie de una célula y preferentemente unen FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una inmunoglobulina y en algunos casos, la inmunoglobulina es un anticuerpo, en donde la región Fv de dicho anticuerpo une específicamente IgE. De manera adecuada, dicho anticuerpo une tanto IgE circulante como anclada a la membrana. De manera alternativa y adecuada, dicho anticuerpo une selectivamente la IgE anclada a la membrana con respecto a la IgE circulante. De manera adecuada, la molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico que tiene una primera región específica objetivo y una segunda región específica objetivo, en donde la primera región específica objetivo une IgE y la segunda región específica objetivo une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la primera y segunda regiones específicas objetivo son regiones Fv, en donde la primera región Fv une IgE y la segunda región Fv une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, el compañero de fusión Fc de la inmunoglobulina une IgE.

De manera adecuada, la molécula de cohesión se une con FcγRIIb, en donde la afinidad de dicha unión tiene una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, p. ej., inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM.

De manera adecuada, la molécula de cohesión que cohesiona IgE y FcγRIIb con alta afinidad incluye una inmunoglobulina variante con respecto a una inmunoglobulina original. De manera adecuada, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (p. ej., dos o más) modificaciones en comparación con una región Fc original, en donde dichas modificaciones están en posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 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 un índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 235, 236, 266, 267, 268, 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice EU.

De manera adecuada, dichas modificaciones son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 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 un índice EU. De manera adecuada, dichas modificaciones son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 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 donde la numeración es de

acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichas modificaciones son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 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 un índice EU. De manera adecuada, dichas modificaciones son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 234E, 235Y, 235R, 236D, 236N, 237N, 266M, 267E, 268E, 268D, 327D, 327E, 328F, 328Y, 328W, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichas modificaciones son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU.

De manera adecuada, dichas modificaciones resultan en al menos una de las siguientes combinaciones de 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 un índice EU.

De manera adecuada, las modificaciones descritas en la presente reducen la afinidad al menos a un receptor con respecto a la inmunoglobulina original, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa. En este caso, las variantes de inmunoglobulina descritas en la presente pueden mediar ADCC o ADCP reducida respecto de la inmunoglobulina original. De manera adecuada, las modificaciones descritas en la presente aumentan la afinidad al menos a un receptor con respecto a la inmunoglobulina original, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa. De manera adecuada, las variantes de inmunoglobulina descritas en la presente pueden mediar ADCC o ADCP aumentada con respecto a la inmunoglobulina original.

La memoria descriptiva también describe métodos para modificar genéticamente las moléculas de cohesión novedosas, inclusive composiciones de inmunoglobulina.

La memoria descriptiva también describe ácidos nucleicos aislados que codifican las moléculas de cohesión, inclusive las inmunoglobulinas descritas en la presente. La memoria descriptiva también describe vectores que comprenden los ácidos nucleicos, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. La memoria descriptiva también describe células hospedadoras que contienen los vectores y métodos para producir y opcionalmente recuperar las moléculas de cohesión.

La memoria descriptiva también describe moléculas de cohesión que comprenden las inmunoglobulinas descritas en la presente. Las moléculas de cohesión pueden ser útiles en un producto terapéutico. De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden ser anticuerpos.

La memoria descriptiva también describe composiciones que comprenden moléculas de cohesión descritas en la presente y un portador o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

La memoria descriptiva también describe un método para inhibir las células IgE+ FcγRIIb+. Los métodos para inhibir células descritos en la presente comprenden poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, dicha molécula de cohesión coadhiere IgE y FcγRIIb en la superficie celular. De manera adecuada, los métodos de inhibición comprenden poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo une IgE mediante su región Fv y en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd de 100 nM o menor. De manera adecuada, dicha región Fc une FcγRIIa y/o FcγRIIIa con una afinidad mayor con respecto a la IgG1 natural. De manera adecuada, los métodos comprenden poner en contacto las células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv une IgE, y dicha segunda región Fv une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Los métodos comprenden poner en contacto las células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

La memoria descriptiva también describe un método para reducir la secreción de IgE. El método incluye poner en contacto una célula IgE+ FcγRII b+ con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión une IgE y FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

La memoria descriptiva también describe un método para inhibir la maduración de células B. Este método incluye poner en contacto una célula IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión une IgE y FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

La memoria descriptiva también describe usos terapéuticos y de diagnóstico para las moléculas de cohesión descritas en la presente. De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se usan para

tratar uno o más trastornos mediados por IgE, p. ej., enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc. que son mediadas por inmunoglobulina IgE. De manera adecuada, los trastornos alérgicos y atópicos que se pueden tratar con las composiciones descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, asma alérgico y atópico, dermatitis atópica y eczema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomielitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, choque anafiláctico y alergias a cualquier variedad de alergias ambientales o a los alimentos. Los métodos de tratamiento descritos en la presente comprenden la administración a un paciente que necesita tal administración de una cantidad terapéutica de una molécula de cohesión que coadhiere IgE y FcγRIIb en la superficie celular.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1. Ilustración del enfoque mecanístico novedoso para inhibir células B IgE⁺ FcγRIIb⁺. Con estímulos apropiados, las células B naturales pueden diferenciarse en células B IgE⁺. La adhesión del antígeno con el receptor de células B IgE activa estas células, que luego se pueden diferenciar en células plasmáticas que liberan la IgE circulante. La unión de IgE circulante se une a FcεR, por ejemplo, en mastocitos, basófilos y eosinófilos, y activa estas células. La liberación de histamina, prostaglandinas y otros mediadores químicos en última instancia resulta en los
15 síntomas clínicos de alergia y asma. Omalizumab, que tiene una región Fc de IgG1 natural, es capaz de bloquear la unión de IgE a anticuerpos anti-IgE FcεR con alta afinidad para FcγRIIb, denominados Anfi-IgE-IIbE en la figura, son capaces no solo de bloquear la unión de IgE a FcεR, sino también de inhibir la activación de células B IgE⁺ mediante cohesión de FcγRIIb mIgE.

20 Figura 2. Sensogramas de resonancia de plasmones superficiales Biacore que muestran la unión de anticuerpos anti-CD19 de variante Fc a FcγRIIb humano.

Figura 3. Afinidades de anticuerpos de variante Fc a FcγR humanos como se determina por Biacore. La gráfica muestra el log(K_A) para la unión de anticuerpos IgG1 variantes y WT a FcγRI humano (I), H131 FcγRIIa (IIa), FcγRIIb (IIb) y V158 FcγRIIIa (V IIIa). La unión de G236D/S267E y S267E/L328F a V158 FcγRIIIa no se pudo detectar. La unión de G236R/L328R (Fc-KO) a todos los receptores evaluados no se pudo detectar.

25 Figura 4. Afinidades de anticuerpos de variante Fc a FcγR humanos como se determina por resonancia de plasmones superficiales Biacore. La tabla proporciona K_D de equilibrio para unir los anticuerpos IgG1 variantes y WT a FcγRI humano, H131 FcγRIIa FcγRIIb y V158 FcγRIIIa, y la cantidad de uniones de cada uno con respecto al IgG1 natural (WT). n.d. = no detectable

30 Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) y CDR de anticuerpos anti-IgE. Los límites de CDR se definieron como se describe anteriormente en función de una alineación estructural de regiones variables de anticuerpo (Lazar et al., 2007, Mol Immunol 44:1986-1998).

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

Figura 7. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos anti-IgE de longitud completa que se pueden usar para dirigirse a células B IgE⁺.

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

Figura 9. Tabla de datos de afinidad para la unión de anticuerpos anti-IgE WT y variantes a la región Fc IgE y FcγRIIb.

Figura 10. ELISA de IgE usando anticuerpos anti-IgE comerciales (MabTech) e internos (Omalizumab y MaE11) como reactivos de captura.

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

Figura 12. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor afinidad a FcγRIIb pero no los anticuerpos que no tienen unión a FcγR (variante Fc G236R/L328R) o que no tienen unión a IgE (motavizumab). La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40) y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

45 Figura 13. Los anticuerpos anti-IgE variantes no inhiben las células B IgG2⁺ con clase cambiada. La gráfica muestra la concentración de IgG2 liberado de PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, α-CD40 y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

50 Figura 14. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor afinidad a FcγRIIb. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40) y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la menor concentración de anticuerpo.

Figura 15. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor afinidad a FcγRIIb. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4,

anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), anticuerpo de reticulación BCR anti- μ y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la menor concentración de anticuerpo.

5 Figura 16. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor afinidad a Fc γ R11b. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), anticuerpo de reticulación BCR anti- μ y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la menor concentración de anticuerpo.

10 Figura 17. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor función efectora ADCC y ADCP. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), anticuerpo de reticulación BCR anti-CD79b y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

Figura 18. Inhibición de células B IgE⁺ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor función efectora ADCC y ADCP. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α -CD40), anticuerpo de reticulación BCR anti- μ y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

15 Figura 19. Protocolo para estudio in vivo de huPBL-SCID para evaluar la actividad de anticuerpos anti-IgE. Los días indicados reflejan la cantidad de días después de injertar las PBMC de un donante con pruebas positivas por anticuerpos IgE específicos para Der p 1. Vac. Derp1 indica vacunación con antígeno Der p 1.

20 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 las extracciones de sangre destacadas 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 grupos 3 H1L1 MaE11 indican los grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una IgG1 WT (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE) o región Fc G236R/L328R (Fc-KO).

25 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 las extracciones de sangre destacadas 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 grupos 3 H1L1 MaE11 indican los grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una IgG1 WT (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE) o región Fc G236R/L328R (Fc-KO). El límite de cuantificación del método ELISA fue 31,6 ng/mL; las muestras que estaban debajo de este límite se informan como 31,6 ng/mL en la gráfica.

Descripción detallada de ejemplos de realizaciones

30 En la presente se describen moléculas de cohesión que imitan los efectos de inhibición de la cohesión de IgE anclado a la membrana con Fc γ R11b en células B. Por ejemplo, en la presente se describen anticuerpos anti-IgE variantes modificados genéticamente de modo que el dominio Fc se une a Fc γ R11b con una afinidad de hasta ~430 veces más. Con respecto a IgG1 natural, las variantes de unión mejorada a Fc γ R11b (IIbE) inhiben fuertemente la movilización y viabilidad de calcio inducido por BCR en las células B IgE⁺ humanas principales. El uso de una única molécula, como un anticuerpo para suprimir las células B funciona por cohesión de BCR IgE cognado y Fc γ R11b puede representar un enfoque novedoso en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE. Los ejemplos no taxativos de enfermedades mediadas por IgE incluyen respuestas alérgicas y asma y se describen más detalladamente a continuación.

40 Las moléculas de cohesión de acuerdo con la descripción pueden adoptar una variedad de configuraciones como se describe más detalladamente a continuación. De manera adecuada, la molécula de cohesión incluye una inmunoglobulina que une IgE y Fc γ R11b con alta afinidad. En este caso, la inmunoglobulina preferentemente cohesiona IgE y Fc γ R11b anclados a la membrana en la superficie de una célula y une con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una molécula biespecífica que tiene una primera región específica objetivo y una segunda región específica objetivo, en donde la primera región específica objetivo une IgE y la segunda región específica objetivo une Fc γ R11b con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, pese a que de manera adecuada, puede unir Fc γ R11b con una Kd inferior a aproximadamente 10 nM o una Kd inferior a aproximadamente 1 nM y en algunos casos puede unir con una Kd inferior a 100 pM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico y la primera y segunda regiones específicas objetivo son regiones Fv, en donde la primera región Fv une IgE y la segunda región Fv une Fc γ R11b con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une Fc γ R11b con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En este caso, el compañero de fusión Fc de la inmunoglobulina une IgE.

En la presente se describen varias definiciones. Se pretende que estas definiciones abarquen equivalentes gramaticales.

55 «ADCC» o «citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos», como se usa en la presente, se refiere a la reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan Fc γ R reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, llevan a la lisis de la célula diana.

«ADCP» o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos, como se usa en la presente, se refiere a la reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, llevan a la fagocitosis de la célula diana.

«Modificación de aminoácidos» en la presente se refiere a una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos. «Sustitución de aminoácido» o «sustitución» en la presente se refiere al remplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S267E se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de cadena pesada constante, en donde la serina en la posición 267 es remplazada por ácido glutámico. «Inserción de aminoácido» o «inserción», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original. «Eliminación de aminoácido» o «eliminación», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original.

«Anticuerpo» en la presente se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo, en seres humanos, incluyen la cadena kappa (κ), lambda (λ) y loci genéticos de cadena pesada, que juntos comprenden los innumerables genes de región variable y los genes de 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 e IgA (IgA1 e IgA2), respectivamente. En la presente, el anticuerpo incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado genéticamente o un anticuerpo generado recombinantemente con fines experimentales, terapéuticos u otros.

«Aminoácido» e «identidad de aminoácido», como se usan en la presente, se refieren a uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquier análogo no natural que puede estar presente en una posición definida específica.

«Célula CD32b+» o «célula FcγRIIb+», como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula o tipo celular que expresa CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b+ incluyen, pero no se limitan a, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos.

«Célula IgE+», como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula o tipo celular que expresa IgE. En casos preferidos, las células IgE+ expresan IgE anclada a la membrana (mIgE). Las células IgE+ incluyen, pero no se limitan a, células B y células plasmáticas.

«CDC» o «citotoxicidad dependiente del complemento», como se usa en la presente, se refiere a la reacción en la cual uno o más componentes de proteína de complemento reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, provocan posteriormente la lisis de la célula diana.

«Molécula de cohesión» o equivalentes gramaticales se refieren a una molécula bifuncional capaz de unir IgE y FcγRIIb en donde la Kd de la unión de la molécula a FcγRIIb es inferior a aproximadamente 100 nM en una superficie celular que resulta en la unión simultánea de IgE y FcγRIIb.

«Región constante» de un anticuerpo como se define en la presente se refiere a la región del anticuerpo codificada por uno de los genes de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada. «Cadena ligera constante» o «región constante de cadena ligera», como se usa en la presente, se refiere a la región de un anticuerpo codificada por las cadenas ligeras kappa (Cκ) o lambda (Cλ). La cadena ligera constante típicamente comprende un único dominio y como se define en la presente se refiere a las posiciones 108-214 de Cκ o Cλ, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU. «Cadena pesada constante» o «región constante de cadena pesada» como se usa en la presente se refiere a la región de un anticuerpo codificada 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 IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, como se define en la presente, se refiere al extremo N del dominio CH1 al extremo C del dominio CH3, que comprende de este modo las posiciones 118-447, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU.

«Función efectora», como se usa en la presente, se refiere a un evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor Fc o ligando. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR como ADCC y ADCP y funciones efectoras mediadas por complemento como CDC.

«Célula efectora» como se usa en la presente se refiere a una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores Fc y/o de complemento y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos (NK) y linfocitos T γδ y pueden ser de cualquier organismo que incluye, pero no se limita a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

«Fab» o «región Fab», como se usa en la presente, se refiere a los polipéptidos que comprenden los dominios VH, CH1, VL y CL de inmunoglobulina. Fab se puede referir a esta región sola o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.

«Fc» o «región Fc», como se usa en la presente, se refiere al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD y IgG y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el extremo N de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Pese a que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define generalmente como que comprende los residuos C226 o P230 a su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Fc se puede referir a esta región sola o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación.

«Polipéptido Fc» como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que comprende toda la región Fc o parte de esta. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fc aislados y fragmentos Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser polipéptidos Fc.

«Fusión Fc» como se usa en la presente se refiere a una proteína en donde uno o más polipéptidos están enlazados operativamente a Fc. En la presente, fusión Fc se usa como sinónimo de los términos «inmuno adhesina», «fusión Ig», «quimera Ig» y «globulina receptora» (a veces con guiones) como se usa en la técnica previa (Chamow et ál., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et ál., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con un compañero de fusión que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. El rol de la parte que no es Fc de una fusión Fc, es decir, el compañero de fusión, es mediar la unión a la diana, y por lo tanto es análoga en cuanto a función de las regiones variables de un anticuerpo. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña se puede enlazar a Fc para generar una fusión Fc. Los compañeros de fusión de proteína pueden incluir, pero no se limitan a, la región de unión a una diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión Fc a una diana terapéutica. Estas dianas pueden ser cualquier molécula, p. ej., un receptor extracelular implicado en una enfermedad.

«Receptor Fc gamma» o «FcyR», como se usa en la presente, se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas que une la región Fc del anticuerpo IgG y está sustancialmente codificado por los genes FcyR. En los seres humanos esta familia incluye, pero no se limita a FcyRI (CD64), inclusive las isoformas FcyRIa, FcyRIb y FcyRIc; FcyRII (CD32), inclusive las isoformas FcyRIIa (inclusive los alotipos H131 y R131), FcyRIIb (inclusive FcyRIIb-1 y FcyRIIb-2), y FcyRIIc; y FcyRIII (CD16), inclusive las isoformas FcyRIIIa (inclusive los alotipos V158 y F158) y FcyRIIIb (inclusive los alotipos FcyRIIIb-NA1 y FcyRIIIb-NA2) (Jefferis et ál., 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como cualquier FcyR humano no descubierto o isoformas o alotipos de FcyR. Un FcyR puede ser de cualquier organismo, inclusive, de modo no taxativo, humanos, ratones, conejos y monos. Los FcyR de ratón incluyen, pero no se limitan a FcyRI (GD64), FcyRII (CD32), FcyRIII (CD16) y FcyRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcyR de ratón no descubierto o isoformas o alotipos de FcyR.

«Ligando Fc» o «receptor Fc», como se usa en la presente, se refiere a una molécula, p. ej., un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de Fc y ligando. Los ligandos Fc incluyen pero no se limitan a FcyR, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estreptocócica, proteína G estreptocócica y FcyR viral. Los ligandos Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc homólogos a FcyR (Davis et ál., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

«Anticuerpo de longitud completa», como se usa en la presente, se refiere a la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo inclusive regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, inclusive seres humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, en donde cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL y cada cadena pesada comprende dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3. En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc.

«Inmunoglobulina» en la presente se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos (inclusive anticuerpos biespecíficos) y fusiones Fc. Las inmunoglobulinas pueden tener una cantidad de formas estructurales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y dominios de inmunoglobulina individual.

«Dominio de inmunoglobulina (Ig)», como se usa en la presente, se refiere a una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural diferente como lo determinará un experto en la técnica de estructura de proteína. Los dominios de Ig típicamente tienen una topología de plegado tipo β -sándwich. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo IgG de anticuerpos son VH, Cy1, Cy2, Cy3, VL, y CL.

«IgG» o «inmunoglobulina IgG» o «inmunoglobulina G», como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que se codifican sustancialmente por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En los seres humanos esta clase comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

5 «IgE» o «inmunoglobulina IgE» o «inmunoglobulina E», como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que se codifican sustancialmente por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. IgE puede estar anclada a la membrana (mIgE) o no anclada a la membrana, también denominada en la presente IgE circulante.

«Inhibición» de células o equivalentes gramaticales se refiere a evitar o reducir la activación, proliferación, maduración o diferenciación de células dirigidas.

10 «Isotipo», como se usa en la presente, se refiere a 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, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

15 «Modificación» en la presente se refiere 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 modificaciones de aminoácido y modificaciones de glicofoma.

20 «Modificación de glicofoma» o «glicofoma modificada» o «glicofoma modificada genéticamente», como se usa en la presente, se refiere a una composición de carbohidratos que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de la proteína original. La glicofoma modificada se refiere típicamente al carbohidrato u oligosacárido diferente; por lo tanto, por ejemplo, una variante Fc puede comprender una glicofoma modificada. De manera alternativa, glicofoma modificada se puede referir a la variante Fc que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente.

25 «Polipéptido original», «proteína original», «inmunoglobulina original», «polipéptido precursor», «proteína precursora» o «inmunoglobulina precursora», tal como se usa en la presente, hacen referencia a un polipéptido, proteína o inmunoglobulina no modificada que está sustancialmente modificada para generar una variante, por ejemplo, cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que sirva como una plantilla y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en la presente. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o versión modificada genéticamente de un polipéptido de origen natural. Polipéptido de origen natural puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido original o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, «polipéptido Fc original» como se usa en la presente se refiere a un polipéptido Fc que se modifica para generar un polipéptido Fc variante y por «anticuerpo variante» como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante (p. ej., un anticuerpo original puede incluir, pero no se limita a, una proteína que comprende la región constante de una Ig de origen natural).

30

35 «Posición» como se usa en la presente se refiere a una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones se pueden enumerar secuencialmente o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice de EU como se describe en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en la IgG1 de anticuerpo humano.

«Polipéptido» o «proteína», como se usa en la presente, significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

40 «Residuo» como se usa en la presente se refiere a una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la asparagina 297 (también referida como Asn297 o N297) es un residuo en el anticuerpo humano IgG1.

«Antígeno diana» como se usa en la presente se refiere a la molécula que está unida específicamente por la región variable de un anticuerpo dado o el compañero de fusión de una fusión Fc. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. Se dice que un anticuerpo o fusión Fc es «específico» de un antígeno diana dado en función de que tiene afinidad por el antígeno diana.

45 «Célula diana» como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa un antígeno diana.

«Región variable», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes V κ , V λ y/o V μ que conforman los loci genéticos de inmunoglobulina de cadena pesada, kappa y lambda, respectivamente.

50 «Polipéptido variante», «variante de polipéptido» o «variante» como se usa en la presente se refiere a una secuencia de polipéptidos que difiere de la de una secuencia de polipéptido original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (WT) o puede ser versión modificada de un polipéptido WT. Polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido o a la secuencia de amino que lo codifica. De manera adecuada, los polipéptidos variantes descritos en la presente (p. ej., inmunoglobulinas variantes) pueden tener al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido original, p. ej., de aproximadamente una a

55

aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc. en comparación con el original. La secuencia de polipéptido variante en la presente puede poseer al menos aproximadamente 80 % de homología con una secuencia de polipéptido original, p. ej., al menos aproximadamente 90 % de homología, 95 % de homología, etc. Por consiguiente, «variante Fc» o «Fc variante» como se usa en la presente se refiere a una secuencia Fc que difiere de la de una secuencia Fc original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Una variante Fc puede solo abarcar una región Fc o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión Fc, Fc aislado, fragmento Fc u otro polipéptido que es sustancialmente codificado por Fc. Variante Fc puede referirse al polipéptido Fc en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. «Variante de polipéptido Fc» o «polipéptido Fc variante», como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido Fc que difiere de un polipéptido Fc original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. «Variante de proteína» o «proteína variante», como se usa en la presente, se refiere a una proteína que difiere de una proteína original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. «Variante de anticuerpo» o «anticuerpo variante», como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. «Variante de IgG» o «IgG variante», como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. «Variante de inmunoglobulina» o «inmunoglobulina variante» como se usa en la presente se refiere a una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina original en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

«Tipo salvaje» o «WT» en la presente se refiere a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, inclusive variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG WT, etc. tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se modificó intencionalmente.

Moléculas de cohesión

Como se describe en la presente, moléculas de cohesión son moléculas bifuncionales capaces de unirse a FcγRIIb e 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 cohesión son proteináceas, pese a que eso no es un requisito necesario. De manera adecuada, la molécula de cohesión puede ser una molécula bifuncional en la que la especificidad por FcγRIIb y/o IgE es conferida por una molécula pequeña, ácido nucleico y/o polipéptido, por ejemplo. Preferentemente, la molécula de cohesión se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión incluye una inmunoglobulina que une IgE y FcγRIIb con alta afinidad. En este caso, la inmunoglobulina preferentemente coadhiere IgE y FcγRIIb anclados a la membrana en la superficie de una célula. De manera adecuada, la molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico que tiene una primera región específica objetivo y una segunda región específica objetivo, en donde la primera región específica objetivo une IgE y la segunda región específica objetivo une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico y la primera y segunda regiones específicas objetivo son regiones Fv, en donde la primera región Fv une IgE y la segunda región Fv une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En este caso, el compañero de fusión Fc de la inmunoglobulina une IgE.

De manera adecuada, la molécula de cohesión es una molécula bifuncional en la que una primera región une IgE y una segunda región une FcγRIIb con una Kd inferior que aproximadamente 100 nM. Prácticamente toda proteína, molécula pequeña o ácido nucleico, p. ej., aptámeros, se puede unir para generar la molécula de unión bifuncional y puede incluir enlazadores como se describe en la presente. De manera adecuada, los compañeros de fusión de proteína pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de un anticuerpo, la región de unión a una diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente que dirige la molécula de cohesión a un antígeno diana, como IgE. De manera adecuada, la molécula de cohesión puede comprender FcεRI o FcεRII/CD23 como un compañero de fusión. De manera adecuada, las inmunoglobulinas son útiles como moléculas de cohesión.

Inmunoglobulinas

Como se describe en la presente, una inmunoglobulina es un componente preferido de una molécula de cohesión y puede ser un anticuerpo, una fusión Fc, un Fc aislado, un fragmento Fc o un polipéptido Fc. En algunas realizaciones, una inmunoglobulina es un anticuerpo. Como se describe en más detalle a continuación, la inmunoglobulina es útil como molécula bifuncional en la que la región Fv une IgE y la región Fc une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Además, un anticuerpo es útil en fusiones Fc o anticuerpos bifuncionales como se describe a continuación.

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, lo que incluye seres humanos y ratones, los anticuerpos se construyen de cadenas de polipéptidos pesada y ligera emparejadas. Las regiones variables de cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia considerable entre anticuerpos y son responsables de la unión del antígeno diana. Cada cadena está conformada por dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales y, por lo tanto, el término genérico inmunoglobulina se usa para tales proteínas.

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena «ligera» (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una «pesada» (que típicamente tiene un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa o 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 no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. La IgA tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 y IgA2. Por lo tanto, «isotipo», como se usa en la presente, se refiere a 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 IgE.

Cada una de las cadenas ligera y pesada está hecha de dos regiones distintas, denominadas regiones variable y constante. La cadena pesada de IgG está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina enlazados desde el extremo N al C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, que se refiere al dominio variable de cadena pesada, dominio constante de cadena pesada 1, dominio constante de cadena pesada 2 y dominio constante de cadena pesada 3, respectivamente (también denominada VH-G γ 1-C γ 2-C γ 3, que se refiere al dominio variable de cadena, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2 y dominio constante gamma 3 respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta de dos dominios de inmunoglobulina enlazados del extremo N al C en el orden VL-CL, que se refiere al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia y son responsables por la unión de una cantidad de proteínas naturales para provocar eventos bioquímicos importantes. Los rasgos distintivos entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, pese a que pueden existir diferencias más sutiles en la región variable.

La región variable de un anticuerpo contiene las determinantes de unión al antígeno de la molécula y por lo tanto determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se denomina así debido a que es la que tiene secuencia más distinta de otros anticuerpos en la misma clase. La parte de extremo amino de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables por el reconocimiento de antígenos. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de complementariedad (en lo sucesivo denominada «CDR») donde la variación en la secuencia de aminoácidos es lo más significativo. Hay 6 CDR en total, tres por cada por cadena pesada y ligera, denominadas CDR1 VH, CDR2 VH, CDR3 VH, CDR1 VL, CDR2 VL y CDR3 VL. La región variable fuera de las CDR se denomina región marco (FR). Pese a que no son tan diversas como las CDR, la variabilidad de secuencia ocurre en la región FR entre diferentes anticuerpos. En su totalidad, esta arquitectura característica de anticuerpos proporciona un andamiaje estable (la región FR) desde el cual se puede explorar la diversidad de unión al antígeno sustancial (las CDR) por el sistema inmune para obtener especificidad por un amplio conjunto de antígenos. Una cantidad de estructuras de alta resolución están disponibles para una variedad de fragmentos de región variable de diferentes organismos, algunos no unidos y algunos en complejo con el antígeno. Las características de estructura y secuencia de las regiones variables de anticuerpo se describen, por ejemplo, en Morea et ál., 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea et ál., 2000, *Methods* 20:267-279 y las características conservadas de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Maynard et ál., 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376.

La parte de extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. En la presente, «dominio de inmunoglobulina (Ig)» se refiere a una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria diferente. De interés en los casos descritos en la presente son los dominios de cadena pesada que incluyen los dominios pesados constantes (CH) y la región bisagra. En el contexto de anticuerpos IgG, los isotipos IgG tienen tres regiones CH cada uno. Por consiguiente, los dominios «CH» en el contexto de IgG son los siguientes: «CH1» se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. «CH2» se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat y «CH3» se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

Otra región importante de la cadena pesada es la región bisagra. «Bisagra» o «región bisagra» o «región bisagra de anticuerpo» o «región bisagra de inmunoglobulina» en la presente se refiere al polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición UE 220 y el dominio CH2 de IgG comienza en el residuo UE en la posición 237. Por lo tanto, para la IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente de forma que incluya las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1) donde la numeración se hace de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunos casos, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, donde la «bisagra inferior» generalmente se refiere a las posiciones 226 o 230 a 236.

De interés en los casos descritos en la presente son las regiones Fc. «Fc» o «región Fc», como se usa en la presente, se refiere al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD y IgG y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el extremo N de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir

la cadena J. Para IgG, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Pese a que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define generalmente que incluye los residuos C226 o P230 a su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Fc se puede referir a esta región sola o esta

5 región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación. «Polipéptido Fc» como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que comprende toda la región Fc o parte de esta. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fc aislados y fragmentos Fc.

La región Fc de un anticuerpo interactúa con una cantidad de receptores y ligandos Fc, impartiendo un conjunto de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Para IgG la región Fc, Fc comprende dominios de Ig Cy2 y Cy3 y la bisagra de extremo N que lleva a Cy2. Una familia importante de receptores Fc para la clase de IgG son los receptores Fc gamma (FcyR). Estos receptores median la comunicación entre anticuerpos y el lado celular del sistema inmune (Raghavan et ál., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ravetch et ál., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). En los seres humanos esta familia de proteínas incluye FcyRI (CD64), inclusive las isoformas FcyRIa, FcyRIb y FcyRIc; FcyRII (CD32), inclusive las isoformas FcyRIIa (inclusive los alotipos H131 y R131), FcyRIIb (inclusive FcyRIIb-1 y FcyRIIb-2), y FcyRIIc; y FcyRIII (CD16), inclusive las isoformas FcyRIIIa (inclusive los alotipos V158 y F158) y FcyRIIIb (inclusive los alotipos FcyRIIIb-NA1 y FcyRIIIb-NA2) (Jefferis et ál., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Estos receptores típicamente tienen un dominio extracelular que media la unión a Fc, una región que abarca la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar algún evento de señalización en la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunitarias que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, linfocitos citolíticos (NK) y células T $\gamma\gamma$. La formación del complejo Fc/FcyR recluta estas células efectoras a sitios de antígeno unido, que resultan típicamente en eventos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunes posteriores como la liberación de mediadores de inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad de mediar funciones efectoras citotóxica y fagocíticas es un potencial mecanismo por el cual los anticuerpos destruyen células dirigidas. La reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcyR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés) (Raghavan et ál., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et ál., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766; Ravetch et ál., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). La reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcyR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente provocan fagocitosis de la célula diana se denomina fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCP).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades para los FcyR, en donde IgG1 e IgG3 típicamente se unen sustancialmente mejor a los receptores que la IgG2 e IgG4 (Jefferis et ál., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Los FcyR unen la región Fc de IgG con diferentes afinidades. Los dominios extracelulares de FcyRIIIa y FcyRIIIb son 96 % idénticos, sin embargo, FcyRIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que FcyRI, FcyRIIa/c y FcyRIIIa son reguladores positivos de la activación disparada por el complejo inmune, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación inmunoreceptora basado en tirosina (ITAM, por sus siglas en inglés), γ RIIb tiene un motivo de inhibición inmunoreceptora basado en tirosina (ITIM) y por lo tanto actúa como inhibidor. Por lo tanto, los primeros se denominan receptores de activación y FcyRIIIb se denomina receptor inhibidor. Pese a estas diferencias en afinidades y actividades, todos los FcyR se unen en la misma región en Fc, en el extremo N terminal del dominio Cy2 y la bisagra anterior. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann et ál., 2001, *J Mol Biol* 309:737-749), y varias estructuras del Fc humano unido al dominio extracelular de FcyRIIIb humano se han solucionado (código de acceso pdb 1E4K) (Sondermann et ál., 2000, *Nature* 406:267-273) (códigos de acceso pdb 1IIS y 1IIX) (Radaev et ál., 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477).

Un sitio que se superpone pero separado en Fc sirve como la interface para la proteína de complemento C1q. Del mismo modo que la unión a Fc/FcyR media ADCC, la unión a Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cy2 y Cy3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión del cual recicla anticuerpos endocitados desde el endosoma nuevamente hacia el flujo sanguíneo (Raghavan et ál., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et ál., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766). Este proceso, acoplado con la exclusión de filtración del riñón debido al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado semividas en suero del anticuerpo favorables que oscilan de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también cumple un rol clave en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión de FcRn en Fc es también el sitio en el que las proteínas bacterianas A y G se unen. La unión estrecha por estas proteínas es típicamente explotada como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad a proteína A o proteína G durante la protección de proteínas. La fidelidad de estas regiones, las regiones de complemento y de unión FcRn/proteína A son importantes tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos y su desarrollo.

Un rasgo clave de la región Fc es la glicosilación unida a N conservada que ocurre en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como se denomina a veces, tiene un rol estructural y funcional crítico para el anticuerpo y es una de las razones principales por las que los anticuerpos se deben producir usando sistemas de expresión de mamíferos. La unión eficaz de Fc a FcyR y C1q requiere de esta modificación y las alteraciones en la composición del carbohidrato N297 o su eliminación afectan la unión de estas proteínas (Umana et ál., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies et ál., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Mimura et ál., 2001, *J Biol Chem* 276:45539-45547.; Radaev et ál., 2001, *J*

Biol Chem 276:16478-16483; Shields et ál., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields et ál., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons et ál., 2002, J Immunol Methods 263:133-147).

Las inmunoglobulinas de los casos descritos en la presente también pueden ser una proteína tipo anticuerpo denominada fusión Fc (Chamow et ál., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et ál., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). En la presente, fusión Fc se usa como sinónimo de los términos «inmuno adhesina», «fusión Ig», «quimera Ig» y «globulina receptora» (a veces con guiones) como se usa en la técnica previa (Chamow et ál., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et ál., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión Fc es una proteína en donde uno o más polipéptidos, denominado en la presente «compañero de fusión» está unido operativamente a Fc. Una fusión Fc combina la región Fc de un anticuerpo y por lo tanto sus funciones efectoras favorables y farmacocinética, con la región de unión a la diana de un receptor, ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. El rol de la última es mediar el reconocimiento de la diana y por lo tanto tiene una funcionalidad análoga a la región variable del anticuerpo. Debido a la superposición estructural y funcional de las fusiones Fc con anticuerpos, la discusión de anticuerpos en la presente descripción también se extiende a fusiones Fc.

Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña se puede enlazar a Fc para generar una fusión Fc. Los compañeros de fusión de proteína pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a una diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citocina, una quimioquina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente que dirija la fusión Fc a un antígeno diana. Tal antígeno diana puede ser cualquier molécula, p. ej., un receptor extracelular implicado en una enfermedad. Las fusiones Fc descritas en la presente preferentemente tienen especificidad por IgE. Por ejemplo, en los casos preferidos, las fusiones Fc de la descripción pueden incluir FcεRI o FcεRII/CD23 como un compañero de fusión. Las fusiones Fc de la descripción preferentemente comprenden una o más variantes en la región Fc que mejoran la afinidad para FcγRIIb.

Los compañeros de fusión se pueden enlazar a cualquier región de una región Fc, inclusive en el extremo N o C o en algún residuo entre los extremos. De manera adecuada, un compañero de fusión está unido al extremo N o C de la región Fc. Una variedad de enlazadores puede ser útiles en algunos casos descritos en la presente para unir covalentemente las regiones Fc a un compañero de fusión. «Enlazador», «secuencia enlazadora», «espaciador», «secuencia de anclaje» o equivalentes gramaticales de estos, en la presente se refieren a una molécula o grupo de moléculas (como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica acerca de reticuladores, páginas 155-200). Se puede usar una cantidad de estrategias para unir moléculas covalentemente entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a, enlaces de polipéptidos entre los extremos N y C de proteínas y dominios de proteínas, enlace mediante enlace disulfuro y enlace mediante reactivos de reticulación química. De manera adecuada, el enlazador es una unión peptídica, generada por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debería tener una longitud que es adecuada para enlazar dos moléculas de modo tal que asuman la conformación correcta una respecto de la otra de modo que retengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas a estos efectos incluyen residuos de al menos uno y no más de 50 aminoácidos. De manera adecuada, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. De manera adecuada, se pueden usar enlazadores h de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (inclusive, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:1), (GGGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:2), y (GGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:3), en donde n es un entero de al menos uno), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como lo comprenderán los expertos en la técnica. De manera alternativa, una variedad de polímeros no proteínicos que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden ser útiles como enlazadores, es decir, pueden ser útiles para enlazar una región Fc a un compañero de fusión.

También se contemplan como compañeros de fusión los polipéptidos Fc. Por lo tanto, una inmunoglobulina como se describe en la presente puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende dos o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión a los receptores Fc con una molécula de proteína única. De manera adecuada, las regiones Fc se pueden enlazar usando un enfoque de ingeniería química. Por ejemplo, las Fab y Fc se pueden enlazar por enlaces tioéter que se originan en residuos de cisteína en las bisagras, generando moléculas como FabFc₂. Las regiones Fc se pueden enlazar usando ingeniería de disulfuro y/o reticulación química. De manera adecuada, las regiones Fc pueden enlazarse genéticamente. De manera adecuada, las regiones Fc en una inmunoglobulina se enlazan genéticamente a regiones Fc generadas enlazadas en tándem como se describe en USSN 11/022,289 (US2005-0249723 A1), presentado el 21/12/2004, con el título "*Fc polypeptides with novel Fc ligand binding sites*". Los polipéptidos Fc enlazados en tándem pueden comprender dos o más regiones Fc, p. ej., una a tres regiones Fc, dos regiones Fc. Puede ser ventajoso explorar una cantidad de construcciones genéticamente modificadas para obtener regiones Fc enlazadas en homo- o hetero-tándems con las propiedades funcionales y estructuras más favorables. Las regiones Fc enlazadas en tándem puede ser regiones Fc enlazadas por homo-tándem, es decir una región Fc de un isotipo se fusiona genéticamente a otra región Fc del mismo isotipo. Se anticipa que debido a que hay múltiples sitios de unión a FcγR, C1q y/o FcRn en polipéptidos Fc enlazados en tándem, las funciones efectoras y/o farmacocinética se pueden mejorar. De manera adecuada, las regiones Fc de diferentes isotipos se pueden enlazar en tándem, denominadas en la presente regiones Fc enlazadas en hetero-tándem. Por

ejemplo, debido a que la capacidad de dirigirse a receptores FcγR y FcαRI, una inmunoglobulina que se une a FcγR y FcαRI puede proporcionar una mejora clínica considerable.

Las inmunoglobulinas de los casos descritos en la presente pueden codificarse sustancialmente por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpo. En determinados casos, las inmunoglobulinas descritas en la presente son útiles en anticuerpos o fusiones Fc que comprenden secuencias pertenecientes a la clase IgG de anticuerpos, inclusive IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. La figura 1 proporciona una alineación de estas secuencias IgG humanas. En casos alternativos, las inmunoglobulinas descritas en la presente son útiles en anticuerpos o fusiones Fc que comprenden secuencias pertenecientes a la clase IgA (incluidas las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG o IgM de anticuerpos. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender más de una cadena de proteínas, p. ej., pueden ser un anticuerpo o fusión Fc que es un monómero o un oligómero, inclusive un homo-oligómero o un hetero-oligómero.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden codificar sustancialmente por genes de cualquier organismo, p. ej., mamíferos (inclusive, pero sin limitarse a seres humanos, roedores (inclusive, pero sin limitarse a ratones y ratas), lagomorfos (inclusive, pero sin limitarse a conejos y liebres), camélidos (inclusive, pero sin limitarse a camellos, llamas y dromedarios) y primates no humanos, inclusive, pero sin limitarse a prosimios, platirrinos (monos del nuevo mundo), cercopitécidos (monos del viejo mundo) y homínidos que incluyen gibones y grandes simios y pequeños simios. En determinados casos, las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ser sustancialmente humanas.

Como se sabe en la técnica, los polimorfismos de inmunoglobulinas existen en la población humana. Los polimorfismos Gm se determinan por los genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que tienen alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos denominados G1m, G2m y G3m para marcadores de las moléculas de IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se encontraron alotipos Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores se pueden clasificar en «alotipos» e «isoalotipos». Estos se distinguen en diferentes bases serológicas dependiendo de la fuerte homología de secuencia entre los isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicas especificados por formas alélicas de los genes Ig. Los alotipos representan leves diferencias en las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada o ligera de diferentes individuos. Incluso una diferencia de un solo aminoácido puede dar lugar a una determinante alotípica, pese a que en muchos casos ocurrieron sustituciones de varios aminoácidos. Los alotipos son diferencias de secuencia entre alelos de una subclase por las cuales el antisuero reconoce solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que se comparte con una región homóloga no polimórfica de uno o más isotipos diferentes y debido a esto el antisuero reaccionará tanto con los alotipos relevantes como con 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 inmunoglobulinas humanas se han caracterizado bien (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 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 et ál., 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9). Actualmente se conocen 18 alotipos 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, et ál., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, págs. 43-78 (1990); Lefranc, G. et ál., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se injertan en combinaciones fijas se denominan haplotipos Gm. Las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden codificar sustancialmente por un alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden componer un polipéptido Fc que incluye, pero no se limita a anticuerpos, Fc aisladas, fragmentos de Fc y fusiones Fc. En un caso, una inmunoglobulina descrita en la presente es un anticuerpo de longitud completa que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo inclusive regiones variables y constantes. Para el isotipo IgG, el anticuerpo de longitud completa es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, en donde cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL y cada cadena pesada comprende dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3. En otro caso, las inmunoglobulinas descritas en la presente son regiones Fc aisladas o fragmentos de Fc.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden tener una variedad de estructuras que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces se hace referencia a ellos en la presente como «anticuerpos miméticos»), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de fusión (a veces se hace referencia a estos como «conjugados de anticuerpos»), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

En un caso, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, de modo no taxativo, (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 simple; (iv) el fragmento dAb que consiste en una variable única, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un

sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros Fc de cadena simple biespecíficos y (ix) «diacuerpos» o «triacuerpos», fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión genética. Los fragmentos de anticuerpo pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse con la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos se describen en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 y las referencias citadas allí.

En un caso, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo multiespecífico y, en particular, un anticuerpo biespecífico, a menudo denominado «diacuerpos». Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos se pueden fabricar en una variedad de formas conocidas en la técnica, p. ej., preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos. En un caso, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc y puede incluir algunas o todas las regiones bisagra. Para obtener una descripción de anticuerpos multiespecíficos véase Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 y referencias citadas en la presente.

Anticuerpos no humanos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos

La región variable de un anticuerpo, como se conoce en la técnica puede estar compuesta de secuencias de una variedad de especies. En algunos casos, la región variable de anticuerpo puede ser de una fuente no humana que incluye, pero no se limita a, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas y monos. En algunos casos, los componentes de andamiaje pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los «anticuerpos quiméricos» como los «anticuerpos humanizados» se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los «anticuerpos quiméricos» comprenden tradicionalmente región o regiones variables de un ratón u otra especie no humana y la región o regiones constantes de un humano.

«Anticuerpos humanizados» se refieren generalmente a anticuerpos no humanos a los que se les intercambiaron las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo total, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, alguna o todas las cuales están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano se injertan en el marco de lámina beta de la región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo cuya especificidad se determina mediante las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe en, p. ej., WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et ál., 1988, Science 239:1534-1536. La «retromutación» de residuos marco de aceptor seleccionados a los residuos de donante correspondientes se requiere frecuentemente para volver a ganar afinidad perdida en la construcción que se injertó inicialmente (patente estadounidense n.º 5,693,762. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también se pueden generar usando ratones con un sistema inmune genéticamente modificado. Roque et ál., 2004, Bio-technol. Prog. 20:639-654. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos se conocen en la técnica (véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EUA) y las referencias citadas allí). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpo no humano pueden incluir métodos de revestimiento como se describe, por ejemplo, en Roguska et ál., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:969-973. En un caso, el anticuerpo original se maduró por afinidad, como se conoce en la técnica. Los métodos basados en la estructura se pueden emplear para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en la serie estadounidense n.º 11/004,590 (US 2006-0008883 A1). Los métodos basados en selección se pueden utilizar para humanizar y/o madurar por afinidad las regiones variables de anticuerpos, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden implicar injertar solo partes de las CDR inclusive, pero sin limitarse a, métodos descritos en USSN 09/810,502 (US 2002-0034765 A1); Tan et ál., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et ál., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084. Los métodos basados en la estructura se pueden emplear para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en USSN 10/153,159 (US 2002-0177170 A1) y en solicitudes relacionadas. En determinadas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce usando un método descrito en Lazar et ál., 2007, Mol Immunol 44:1986-1998 y USSN 11/004,590 (US 2006-0008883 A1), con el título "*Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof*", presentada el 3 de diciembre de 2004.

En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano con al menos una modificación como se destaca en la presente. «Anticuerpo totalmente humano» o «anticuerpo humano completo» se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia de genes de un anticuerpo que deriva de un cromosoma humano con las modificaciones como se describen en la presente. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden obtener, por ejemplo, usando ratones transgénicos (Bruggemann et ál., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección (Griffiths et ál., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108). En un caso, los anticuerpos equivalentes humanos se pueden generar por computadora como se describe en PCT/US09/41144 (WO2009/129538 A2).

Anticuerpos anti-IgE

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se unen a IgE. Los anticuerpos anti-IgE de la descripción pueden comprender cualquier región variable, conocida o aun no conocida, que tiene especificidad para IgE. Los anticuerpos anti-IgE incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos murinos MaE11, MaE13 y MaE15, versiones humanizadas y/o modificadas genéticamente de estos anticuerpos inclusive E25, E26 y E27, particularmente E25, también conocido como rhuMab-E25, también conocido como Omalizumab, tal como los descritos en US6761889, US6329509, US20080003218A1, y Presta, LG et ál., 1993, *J Immunol* 151:2623-2632. Una versión modificada genéticamente preferida de MaE11 es MaE11 H1L1, descrita en los Ejemplos de la presente. Otros anti-IgE que pueden ser útiles incluyen anticuerpo murino TES-C21, quimérico TES-C21, también conocido como CGP51901 (Corne, J et ál., 1997, *J Clin Invest* 99:879-887; Racine-Poon, A et ál., 1997, *Clin Pharmacol Ther* 62:675-690) y versiones humanizadas y/o modificadas genéticamente de este anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a CGP56901, también conocido como TNX-901, tal como los anticuerpos descritos en Kolbinger, F et ál., 1993, *Protein Eng* 6:971-980. Otros anticuerpos anti-IgE se describen en US6066718, US6072035, PCT/US04/02894 (WO2004/070011 A2), US5342924, US5091313, US5449760, US5543144, US5342924 y US5614611. Otros anticuerpos anti-IgE útiles incluyen el anticuerpo murino BSW17. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de región variable y CDR de algunos de estos anticuerpos se proporcionan en la figura 5.

Variantes Fc y propiedades de unión al receptor Fc

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una variante Fc. Una variante Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos respecto de un polipéptido Fc original, en donde la o las modificaciones de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Una variante Fc descrita en la presente difiere en secuencia de aminoácidos de su original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por lo tanto, las variantes Fc descritas en la presente tienen al menos una modificación de aminoácido en comparación con el original. De manera alternativa, las variantes Fc descritas en la presente pueden tener más de una modificación de aminoácidos en comparación con el original, por ejemplo, de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, p. ej., de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., en comparación con el original. Por lo tanto, la secuencia de las variantes Fc y las del polipéptido Fc original son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias de la variante Fc variantes en la presente tendrán aproximadamente 80 % de homología con la secuencia de la variante Fc original, p. ej., al menos aproximadamente 90 % de homología, al menos aproximadamente 95 % de homología, al menos aproximadamente 98 % de homología, al menos aproximadamente 99 % de homología, etc. Las modificaciones descritas en la presente incluyen modificaciones de aminoácidos, lo que incluye inserciones, eliminaciones y sustituciones. Las modificaciones descritas en la presente también incluyen modificaciones de glicofoma. Las modificaciones se pueden hacer genéticamente usando biología molecular o se pueden hacer enzimática o químicamente.

Las variantes Fc descritas en la presente se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácido que las componen. Por lo tanto, por ejemplo, S267E es una variante Fc con la sustitución S267E respecto del polipéptido Fc original. Asimismo, S267E/L328F define una variante Fc con la sustitución S267E y L328F respecto del polipéptido Fc original. La identidad del aminoácido WT puede ser inespecífica, en cuyo caso la variante antes mencionada es denominada 267E/328F. Cabe destacar que el orden en el que las sustituciones se proporcionan es arbitrario, es decir, por ejemplo, 267E/328F es la misma variante Fc que 328F/267E y así sucesivamente. A menos que se indique otra cosa, las posiciones descritas en la presente se enumeran de acuerdo con el índice EU o esquema de numeración UE (Kabat et ál., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5° ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice EU o índice EU como en Kabat o esquema de numeración EU se refiere a la enumeración del anticuerpo EU (Edelman et ál., 1969, *Proc Natl Acad Sci EUA* 63:78-85);

De manera adecuada, las variantes Fc descritas en la presente se basan en secuencias IgG humanas y por lo tanto las secuencias IgG humanas se usan como las secuencias "base" contra las cuales se comparan las otras secuencias que incluyen, pero no se limitan a secuencias de otros organismos, por ejemplo, secuencias de roedores y primates. Las inmunoglobulinas también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulinas como IgA, IgE, IgGD, IgGM, y similares. Se contempla que, pese a que las variantes Fc descritas en la presente se modifican genéticamente en el contexto de una IgG original, las variantes se pueden modificar genéticamente o "transferirse" al contexto de la otra, segunda IgG original. Esto se hace determinando los residuos y sustituciones «equivalentes» o «correspondientes» entre la primera y segunda IgG, típicamente en función de homología de secuencia o estructural entre las secuencias de la primera y segunda IgG. Para establecer homología, la secuencia de aminoácidos de la primera IgG descrita en la presente se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineación de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando residuos conservados como entre especies), permitiendo inserciones y eliminaciones necesarias para mantener la alineación (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados a través de eliminación e inserción arbitraria), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia principal de la primera inmunoglobulina. La alineación de residuos conservados puede conservar 100 % de estos residuos. Sin embargo, la alineación de más de 75 % o como mínimo 50 % de residuos conservados también es adecuada para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también se pueden definir determinando homología estructural entre una primera y segunda IgG que está a nivel de una estructura terciaria de IgG cuyas estructuras se

determinaron. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de cadena principal de un residuo de aminoácido particular del original o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de aproximadamente 0,13 nm, después de la alineación. De manera adecuada, los residuos equivalentes están dentro de aproximadamente 0,1 nm después de la alineación.

5 La alineación se logra después de orientar y posicionar el mejor modelo para dar la superposición máxima de coordenadas atómicas de átomos de proteína no hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG original en que se hacen las IgG, lo que se pretende comunicar es que las variantes Fc descubiertas como descritas en la presente se pueden modificar genéticamente en cualquier segunda IgG original que tiene homología estructural o de secuencia

10 significativa con la variante Fc. Por lo tanto, por ejemplo, si un anticuerpo variante se genera en donde el anticuerpo original es IgG1 de humano, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede modificarse genéticamente en otro anticuerpo original IgG1 que se une a un antígeno diferente, un anticuerpo original IgG2 humano, un anticuerpo original IgA humano, un anticuerpo original IgG2a o IgG2b de ratón y similares. Nuevamente, como se describe anteriormente, el contexto de la variante Fc original

15 no afecta la capacidad de transferir las variantes Fc descritas en la presente a otros IgG originales.

Las variantes Fc descritas en la presente pueden optimizarse para una variedad de propiedades de unión al receptor de Fc. Una variante Fc que se modifica genéticamente o que se predice que muestra una o más propiedades optimizadas se denomina en la presente «variante Fc optimizada». Las propiedades que se pueden optimizar incluyen, pero no se limitan a, mejor o menor afinidad por un FcγR. De manera adecuada, las variantes Fc descritas en la presente se optimizan para que posean una mejor afinidad por un FcγRIIb receptor inhibitor. En otros casos, las

20 inmunoglobulinas descritas en la presente proporcionan mejor afinidad para FcγRIIb, pero menor afinidad para una o más FcγR de activación, inclusive, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR se pueden expresar en células de cualquier organismo inclusive, pero sin limitarse a, seres humanos, monos cinomolgo y ratones. Las variantes Fc descritas en la presente se pueden optimizar para poseer una mejor afinidad para FcγRIIb humano.

«Mayor afinidad» o «afinidad mejorada» o «afinidad potenciada» o «mejor afinidad» que un polipéptido Fc original, como se usa en la presente se refiere a que una variante Fc se une a un receptor Fc con una constante de asociación de equilibrio significativamente mayor (K_A o K_a) o constante de disociación de menor equilibrio (K_D o K_d) que el polipéptido Fc original cuando las cantidades de polipéptido variante y original en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante Fc con mejor afinidad de unión al receptor Fc puede mostrar una

30 mejora de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces, p. ej., de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces en la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el polipéptido Fc original, en donde la afinidad de unión del receptor Fc se determina, por ejemplo, por métodos de unión descritos en la presente que incluyen, pero no se limitan a, Biacore, por un experto en la técnica. Por consiguiente, «menor afinidad» en comparación con un polipéptido Fc original como se usa en la presente se refiere a que una variante Fc se une a un

35 receptor Fc con una K_A significativamente menor o una K_D mayor que el polipéptido Fc original. Mayor o menor afinidad también se puede definir respecto de un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, según los datos de la presente, IgG1 WT (natural) se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 2 μM, o aproximadamente 2000 nM. Además, algunas variantes Fc descritas en la presente se unen a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 10 veces más a IgG1 WT. Como se describe en la presente, una afinidad mayor o mejorada se refiere a una K_d menor que

40 aproximadamente 100 nM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 nM, o menos que aproximadamente 1 nM.

Los anticuerpos anti-IgE de la invención preferentemente tienen alta afinidad para FcγRIIb. Alta afinidad en la presente se refiere a que la afinidad de la interacción entre el anticuerpo y FcγRIIb es más resistente que 100 nM. Es decir, que la constante de disociación de equilibrio K_d de unión del anticuerpo a FcγRIIb es menor que 100 nM.

45 De manera adecuada, las variantes Fc proporcionan una afinidad selectivamente mejorada a FcγRIIb con respecto a uno o más receptores de activación. Afinidad selectivamente mejorada significa que la variante Fc tiene mejor afinidad por FcγRIIb con respecto al o los receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc original pero tiene menor afinidad para uno o más receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc original, o significa que la variante Fc tiene mejor afinidad tanto para FcγRIIb y receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc original, sin embargo, la mejora en la afinidad es mayor para FcγRIIb que lo es para los receptores de activación. De

50 manera adecuada, variantes Fc reducen o eliminan la unión a uno o más FcγR de activación, reducen o eliminan la unión a una o más proteínas de complemento, reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por FcγR y/o reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por complemento.

La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγR proporciona aun otro parámetro que impacta en la utilidad

55 terapéutica de las variantes Fc descritas en la presente. Mientras que la especificidad y selectividad de una variante Fc dada por las diferentes clases de FcγR afecta significativamente la capacidad de una variante Fc de dirigirse a un antígeno dado por tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o selectividad de una variante Fc por diferentes formas polimórficas de estos receptores puede determinar en parte qué investigación o experimentos preclínicos pueden ser apropiados para evaluar y en última instancia qué poblaciones de pacientes pueden o no

60 responder al tratamiento. Por lo tanto, la especificidad o selectividad de variantes Fc descritas en la presente a polimorfismos del receptor de Fc que incluyen, pero sin limitarse a, FcγRIIa, FcγRIIIa, y similares, se pueden usar para guiar la selección de investigación válida y experimentos preclínicos, diseño de ensayo clínico, selección de pacientes,

dependencia de dosificación y/u otros aspectos relativos a los ensayos clínicos.

Las variantes Fc descritas en la presente pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con receptores Fc que no sean FcγR inclusive, pero sin limitarse a, proteínas de complementos, FcRn y homólogos de receptor Fc (FcRH). FcRH incluyen, pero no se limitan a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5 y FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante Fc dada para tratar una enfermedad dada es el contexto de la variante Fc. Por lo tanto, la selectividad o especificidad de receptor Fc de una variante Fc dada proporcionará diferentes propiedades dependiendo de si compone un anticuerpo, fusión Fc o variantes Fc con un compañero de fusión acoplado. De manera adecuada, la especificidad de receptor Fc de la variante Fc descrita en la presente determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante Fc dada a efectos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno diana y la enfermedad o indicación que se está tratando. Para algunas dianas e indicaciones, una mayor afinidad de FcγRIIb y una función efectora mediada por FcγR de activación reducida puede ser beneficiosa. Para otros antígenos diana y aplicaciones terapéuticas, puede resultar beneficioso aumentar la afinidad por FcγRIIb o aumentar la afinidad por FcγRIIb y receptores de activación.

Medios para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE

En la presente se describen medios para alterar la afinidad a uno o más FcγR. En un caso preferido, la afinidad se altera con respecto al receptor inhibitorio FcγRIIb, por lo cual se altera de este modo la capacidad de la inmunoglobulina para mediar una o más funciones efectoras inhibitorias mediadas por FcγRIIb. Los medios incluyen modificaciones de aminoácidos (p. ej., medios de posición para optimizar la función, medios de sustitución para optimizar la función, etc.) y modificaciones de glicofoma (p. ej., medios para modificaciones de glicofoma).

Modificaciones de aminoácidos

En la presente se describen inmunoglobulinas que comprenden modificaciones de aminoácidos, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad a uno o más FcγR. Preferentemente, dichas modificaciones de aminoácidos mejoran la afinidad a FcγRIIb. Sin embargo, en algunos casos, las modificaciones pueden mejorar la afinidad a uno o más receptores de activación, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIIa. Las modificaciones para alterar la unión a FcγR se describen en USSN 11/124,620 (US2006-0024298 A1), presentada el 5 de mayo de 2005, con el título "*Optimized Fc Variants*" y USSN 12/156,183 (US2009-0136485 A1), presentada el 30 de mayo de 2008, con el título "*Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing Cells*".

Como se describe en la presente, los medios de posición para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE incluyen, pero no se limitan a, modificación de un aminoácido en una o más posiciones de región constante de cadena pesada (p. ej., en las posiciones: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332) que permiten la modificación de las propiedades de unión de inmunoglobulina FcγRIIb, función efectora, y propiedades potencialmente clínicas de anticuerpos.

En particular, los medios de sustitución para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE, p. ej., alterando la afinidad a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a, una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de región constante de cadena pesada, p. ej., una o más de las sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones de región constante de cadena pesada: 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 EU. De manera adecuada, los medios de sustitución incluyen al menos una (p. ej., dos o más) sustituciones en comparación con una región Fc original, en donde dichas modificaciones están en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, los medios de sustitución incluyen una o más (p. ej., dos o más) sustituciones en las posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, de acuerdo con el índice EU.

De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 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 un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 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 donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste

en 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 un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos una sustitución (p. ej., una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) que se seleccionan del grupo que consiste en 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU.

De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (p. ej., una combinación de modificaciones) en posiciones que se seleccionan del grupo que consiste en 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 un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (p. ej., una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (p. ej., una combinación de sustituciones) seleccionadas del grupo que consiste en 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 un índice EU.

De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan 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, 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 un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan 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, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 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, 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 un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan 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, 235D/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/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, 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.

De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan 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 un índice EU.

5 De manera adecuada, la inmunoglobulina puede comprender medios para modificaciones isotípicas, es decir, modificaciones en una IgG original al tipo de aminoácido en una IgG alternativa. Por ejemplo, una variante híbrida de IgG1/IgG3 puede construirse por un medio de sustitución sustituyendo las posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 con los aminoácidos de IgG3 en las posiciones en donde difieren los dos isotipos. Por lo tanto, se puede construir un anticuerpo IgG variante híbrido que comprende uno o más medios de sustitución, p. ej., 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, y 436F. De manera adecuada, una variante híbrida de IgG1/IgG2 puede
10 construirse por un medio de sustitución para sustituir las posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 con los aminoácidos de IgG1 en las posiciones en donde difieren los dos isotipos. Por lo tanto, se puede construir un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprende uno o más medios de sustitución, p. ej., una o más de las siguientes sustituciones de aminoácido: 233E, 234L, 235L, -236G (que refiere a una inserción de una glicina en la posición 236), y 327A.

15 Modificaciones de glicofoma

Muchos polipéptidos, incluidos los anticuerpos, se someten a una variedad de modificaciones postraduccionales que implican restos de carbohidrato, como glicosilación con oligosacáridos. Hay varios factores que pueden influir en la glicosilación. Se ha demostrado que la especie, tejido y tipo celular son importantes en el modo en que ocurre la glicosilación. Además, el ambiente extracelular, a través de condiciones de cultivo alteradas como concentración en
20 suero, puede tener un efecto directo en la glicosilación (Lifely et ál., 1995, *Glycobiology* 5(8): 813-822).

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 carbohidrato enlazado a N. Aparte del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta 30% de IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. IgG tiene un único carbohidrato de dos antenas enlazado a N en Asn297 del dominio CH2. Para IgG de suero o producida ex vivo en hibridomas o células modificadas genéticamente, las IgG son heterogéneas respecto del carbohidrato enlazado a Asn297 (Jefferis et ál., 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76; Wright et ál., 1997, *Trends Biotech* 15:26-32). Para IgG humana, el oligosacárido central consiste normalmente en GlcNAc₂Man₃GlcNAc, con diferentes números de residuos exteriores.

Los restos de carbohidrato de las inmunoglobulinas descritas en la presente se describirán respecto de la nomenclatura usada comúnmente para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química e carbohidratos que usa esta nomenclatura se encuentra en Hubbard et ál. 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 la notación resumida NeuNAc, para ácido 5-N-acetilneuramínico y NeuNGc para ácido 5-glicolilneuramínico.

35 El término «glicosilación» se refiere a la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos entre sí, p. ej., de dos o aproximadamente doce azúcares simples unidos entre sí) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacáridos se enlazan típicamente a la estructura principal de la glicoproteína mediante enlaces N u O. Los oligosacáridos de inmunoglobulinas descritos en la presente ocurren generalmente unidos a un dominio CH2 de una región Fc como oligosacáridos enlazados a N. «Glicosilación enlazada a N» se hace referencia a la unión del resto carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El experto en la técnica reconocerá que, por ejemplo, cada uno de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murino, así como dominios CH2 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanos tienen un único sitio para la glicosilación enlazada a N en el residuo de aminoácido 297 (Kabat et ál. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 1991).

A los efectos de la presente, una «estructura de carbohidrato de núcleo maduro» se refiere a una estructura de carbohidrato de núcleo procesada unida a una región Fc que consiste generalmente en la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc(fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂ típica de oligosacáridos de dos antenas. La estructura de carbohidrato de núcleo procesada está unida a la región Fc de la glicoproteína, generalmente mediante un enlace N a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc. Un «GlcNAc bisecado» es un residuo de GlcNAc unido a la β1,4 manosa de la estructura de carbohidrato de núcleo maduro. El GlcNAc bisecado puede unirse enzimáticamente a la estructura de carbohidrato de núcleo maduro por una enzima β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). Las células CHO normalmente no expresan GnTIII (Stanley et ál., 1984, *J. Biol. Chem.* 261:13370-13378), pero se pueden modificar genéticamente para hacerlo (Umana et ál., 1999, *Nature Biotech.* 17:176-180).

En la presente se describen variantes Fc que comprenden glicofomas modificadas o glicofomas modificadas genéticamente. «Modificación de glicofoma» o «glicofoma modificada genéticamente», como se usa en la presente, se refiere a una composición que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de la proteína original. Las glicofomas modificadas genéticamente pueden ser útiles para diversos fines, lo que incluye, pero sin limitarse a, para potenciar o reducir la función efectora mediada por FcγR. En un caso, las inmunoglobulinas descritas en la presente se modifican para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que están unidos covalentemente a la región Fc.

Una variedad de métodos se conocen en la técnica para generar glicofomas modificadas (Umaña et ál., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et ál., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et ál., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et ál., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); (US 6,602,684; USSN 10/277,370 (US 2003-0157108); USSN 10/113,929 (US 2003-0003097 A1); PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); (tecnología Potelligent™ [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMab™ [biotecnología GLYCART AG, Zurich, Suiza]). Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, mediante la expresión de una IgG en varios organismos o líneas celulares, modificados genéticamente o de otro modo (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células YB2/0 de hibridoma de rata), mediante la regulación de enzimas implicadas en la vía de glicosilación (por ejemplo, FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o (β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o mediante la modificación del o los carbohidratos luego de que se expresó la IgG. Otros métodos para modificar glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen el uso de cepas modificadas genéticamente por glicosilación de levadura (Li et ál., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), moss (Nechansky et ál., 2007, Mol Immunol 44(7): 1826-8) y plantas (Cox et ál., 2006, Nat Biotechnol 24(12): 1591-7). El uso de un método particular para generar una glicofoma modificada no pretende restringir los casos a ese método. Por el contrario, los casos descritos en la presente abarcan variantes Fc con glicofomas modificadas independientemente de cómo se producen.

De manera adecuada, las inmunoglobulinas descritas en la presente se modifican genéticamente para alterar el nivel de sialilación. Mayores niveles de glicanos Fc sialilados en moléculas de inmunoglobulina G pueden impactar la funcionalidad negativamente (Scallon et ál., 2007, Mol Immunol. 44(7):1524-34), y las diferencias en los niveles de sialilación de Fc puede provocar actividad antiinflamatoria modificada (Kaneko et ál., 2006, Science 313:670-673). Debido a que los anticuerpos pueden adquirir propiedades antiinflamatorias tras la sialilación de polisacárido de núcleo Fc, puede ser ventajoso modificar genéticamente por glicosilación las inmunoglobulinas descritas en la presente por un mayor o menor contenido de ácido siálico Fc.

La glicofoma modificada genéticamente se refiere típicamente al carbohidrato u oligosacárido diferente; por lo tanto, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma modificada genéticamente. De manera alternativa, glicofoma modificada genéticamente se puede referir a la inmunoglobulina que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente. De manera adecuada, una composición descrita en la presente comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, p. ej., 80-100 %, 90-100 %, 95-100 %, etc. del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene fucosa. De manera adecuada, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene fucosa y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En un caso alternativo, una composición comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100 % del anticuerpo glicosilado, 80-100 % o 90-100 % del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene ácido siálico. En otro caso, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En aun otro caso, una composición comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100 % o 90-100 % del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que contiene ácido siálico. De manera adecuada, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que contiene ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. De manera adecuada, la combinación de glicofoma modificada genéticamente y la modificación de aminoácido le proporciona propiedades óptimas de unión al receptor Fc al anticuerpo.

45 Otras modificaciones

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no se relacionan específicamente con funciones efectoras mediadas por Fc γ R o complemento en sí mismas. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácido o pueden ser modificaciones que se hacen enzimática o químicamente. Estas modificaciones probablemente proporcionen algo de 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 se pueden hacer acoplando las inmunoglobulinas descritas en la presente con modificaciones adicionales.

De manera adecuada, la región variable de un anticuerpo descrito en la presente puede madurarse por afinidad, es decir, las modificaciones de aminoácido se convirtieron en los dominios VH y/o VL del anticuerpo para mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno diana. Estos tipos de modificaciones pueden mejorar la cinética de asociación y/o disociación para unirse al antígeno diana. Otras modificaciones incluyen las que mejoran la selectividad por antígeno diana en contraste con dianas alternativas. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad por el antígeno expresado en células diana en contraste con las que no son diana. Otras mejoras a las propiedades de reconocimiento objetivas pueden proporcionarse por modificaciones adicionales. Estas propiedades pueden incluir, pero no se limitan a, propiedades cinéticas específicas (es decir, cinética de asociación y disociación), selectividad por la diana particular en contraste con dianas alternativas y selectividad por una forma específica de diana en contraste con formas alternativas. Ejemplos incluyen variantes de longitud completa en contraste con las de corte y empalme, formas de

superficie de célula en contraste con solubles, selectividad por varias variantes polimórficas o selectividad por formas conformacionales específicas del antígeno diana. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan una internalización reducida o mejorada de una inmunoglobulina.

5 De manera adecuada, las modificaciones se hacen para mejorar las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas descritas en la presente que incluye, pero no se limita a, estabilidad, solubilidad y estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la inmunoglobulina como para proporcionar mayor estabilidad o sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares por mayor solubilidad. Otras modificaciones a las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen las que permiten la formación específica de moléculas homodiméricas u homomultiméricas. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, disulfuros modificados genéticamente, así como modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar moléculas homodiméricas covalentes u homomultiméricas. Modificaciones adicionales a las variantes descritas en la presente incluyen las que permiten la formación específica de moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales y/o multifuncionales. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio CH3, en donde las sustituciones reducen la formación de homodímero y aumentan la formación de heterodímero. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios bisagra y CH3, en donde las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

20 De manera adecuada, las inmunoglobulinas descritas en la presente comprenden modificaciones que retiran los sitios de degradación proteolítica. Estas pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasa que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasa que degradan la proteína administrada in vivo. En una realización, se hacen modificaciones adicionales para retirar los sitios de degradación covalente como desamidación (es decir, desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes), oxidación y sitios de degradación proteolítica. Los sitios de desamidación que son de particular utilidad para ser retirados son los que tienen una mayor propensión a la desamidación que incluyen, pero no se limitan a, residuos de asparaginilo y glutamino seguido de glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En estos casos, la sustitución de cualquier residuo puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Los sitios de oxidación comunes incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que se pueden introducir o retirar, incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), acetilación de la amina de extremo N y amidación de cualquier grupo carboxilo de extremo C. Modificaciones adicionales también pueden incluir, pero no se limitan a, modificaciones postraduccionales como glicosilación y fosforilación enlazada a N o enlazada a O.

35 Las modificaciones pueden incluir las que mejoran la expresión y/o rendimientos de purificación de hospedadores o células hospedadoras comúnmente usadas para la producción de biología. Estas incluyen, pero no se limitan a, varias líneas de células de mamíferos (p. ej., CHO), líneas de células de levadura, líneas de células bacterias y plantas. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas de formar enlaces disulfuro entre las cadenas. Modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas de formar enlaces disulfuro dentro de las cadenas.

40 Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácido no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colegas que incluyen pero no se limitan a los métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, *Trends Genet.* 20(12):625-30, Anderson et ál., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 101(2):7566-71, Zhang et ál., 2003, 303(5656):371-3, y Chin et ál., 2003, *Science* 301(5635):964-7. De manera adecuada, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades funcionales, biofísicas, inmunológicas o de fabricación descritas anteriormente. De manera adecuada, estas modificaciones permiten modificación química adicional con otros fines. En la presente se contemplan otras modificaciones. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede estar unida a uno de varios polímeros no proteínicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Se pueden hacer modificaciones de aminoácido adicionales para permitir la modificación química específica o no específica o postraduccionales de las inmunoglobulinas. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación y glicosilación. Las sustituciones específicas que se pueden utilizar para permitir la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, introducción de residuos de cisteína novedosos o aminoácidos no naturales de modo que las químicas de acoplamiento eficaces y específicas se puedan usar para unir una PEG o de otro modo un resto polimérico. La introducción de sitios de glicosilación específicos se puede lograr introduciendo secuencias N-X-T/S novedosas en las inmunoglobulinas descritas en la presente.

55 Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia original a proteínas MHC. Por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos se modificarían genéticamente de modo que haya epítopos inmunes, o solo una cantidad mínima de estos, que se predice que se unirán, con alta afinidad, a cualquier alelo MHC prevalente. Varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en las secuencias de proteína se conocen en la técnica y se pueden usar para puntuar epítopos en un anticuerpo descrito en la presente. Véase, por ejemplo, USSN 09/903,378 (US 2002-0114492 A1), USSN 10/754,296 (US 2004-0230380 A1), USSN 11/249,692 (US 2006-0148009 A1) y referencias citadas allí.

De manera adecuada, las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden combinar con inmunoglobulinas que alteran la unión a FcRn. Estas variantes pueden proporcionar mejores propiedades farmacocinéticas a las inmunoglobulinas. Las variantes preferidas que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, inclusive pero no limitado a, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M (PCT/US2008/088053 (W02009086320 A1), presentada el 22 de diciembre de 2008, con el título "Fc Variants with Altered Binding to FcRn"). Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no se limitan a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et ál., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et ál. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et ál., 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/311S (Dall'Acqua et ál. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et ál., 2006, The Journal of biological chemistry 281:23514-23524).

Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen dentro del alcance de las inmunoglobulinas descritas en la presente, y generalmente, aunque no siempre, se realizan postraduccionalmente. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula al hacer reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas en los residuos de extremo N o C.

En algunos casos, la modificación covalente de los anticuerpos descritos en la presente comprende la adición de una o más etiquetas. El término «grupo de etiquetado» significa cualquier etiqueta detectable. En algunos casos, el grupo marcador se acopla al anticuerpo a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. En la técnica se conocen varios métodos para etiquetar proteínas y se pueden usar para generar inmunoglobulinas presentadas en la presente.

Conjugados

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente son «proteínas de fusión» al anticuerpo, denominadas a veces en la presente «conjugados de anticuerpos». El compañero de fusión o compañero de conjugado puede ser proteináceo o no proteináceo; el último se genera generalmente usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero de conjugado. Los compañeros de conjugado y fusión pueden ser cualquier molécula, inclusive compuestos y polipéptidos químicos de molécula pequeña. Por ejemplo, una variedad de conjugados de anticuerpo y métodos se describen en Trail et ál., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Los posibles compañeros de conjugación incluyen, pero no se limitan a, citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agente quimioterapéutico, agentes anti-angiogénicos, inhibidores de tirosina cinasa y otros agentes terapéuticamente activos. En algunos casos, los compañeros de conjugación se pueden considerar cargas útiles, es decir que el objetivo de un conjugado es la administración dirigida del compañero de conjugación a una célula dirigida, por ejemplo, una célula cancerígena o célula inmune, por la inmunoglobulina. Por lo tanto, por ejemplo, la conjugación de una toxina a una inmunoglobulina se dirige a la administración de dicha toxina a células que expresan el antígeno diana. Como lo comprenderá un experto en la técnica, en realidad los conceptos y las definiciones de fusión y conjugados se superponen. La designación de una función o conjugado no pretende restringirlo a ningún caso particular descrito en la presente. Por el contrario, estos términos se usan en sentido general para transmitir el concepto amplio de que cualquier inmunoglobulina descrita en la presente puede enlazarse genética, químicamente o de otro modo, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseada.

Los conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, etiquetas como se describe a continuación, fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos (p. ej., agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de estas toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena difteria A, cadena exotoxina A, cadena ricina A, cadena abrina A, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Agentes citotóxicos también incluyen radioquímicos hechos por conjugación de radioisótopos a anticuerpos o unión de un radionúclido a un agente quelante que se une covalentemente al anticuerpo. Los casos adicionales utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina y duocarmicinas y análogos.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se fusionan o conjugan a una citocina. «Citocina», como se usa en la presente, es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et ál., 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, las citocinas se pueden fusionar a un anticuerpo para proporcionar un conjunto de propiedades deseables. Los ejemplos de estas citocinas incluyen linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran las hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, la hormona de crecimiento humana de N-metionilo y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroides; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorexina; las hormonas de glicoproteína tales como la hormona folículoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés), la hormona estimulante de la tiroides (TSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; la necrosis tumoral factor-alfa y beta; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso tales como

NGF-beta; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformadores (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; el factor de crecimiento insulínico tipo -I y -II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones tales como interferón -alfa, beta y gamma; los factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como 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; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de orígenes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

De manera adecuada, las moléculas de coadhesión descritas en la presente pueden conjugarse a un «receptor» (como estreptavidina) para el uso en la preselección del objetivo en tumoral donde el conjugado receptor-inmunoglobulina se administra al paciente, seguido por la eliminación de un conjugado no unido de la circulación utilizando un agente aclarador y luego la administración de un «ligando» (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En un caso alternativo, la inmunoglobulina se conjuga o enlaza operativamente a una enzima para utilizar una terapia de profármaco mediada por enzima dependiente de anticuerpo (ADEPT, por su sigla en inglés). ADEPT se puede usar conjugando o enlazando operativamente la inmunoglobulina a una enzima de activación de profármaco que convierte un profármaco (p. ej., un agente quimioterapéutico peptídico).

Cuando los compañeros de inmunoglobulina se usan como conjugados, los compañeros de conjugación se pueden enlazar a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en la presente que incluye, pero no se limita al extremo N o C o en algún residuo entre los extremos. Una variedad de enlazadores puede ser útiles en inmunoglobulinas descritas en la presente para enlazar covalentemente los compañeros de conjugación a una inmunoglobulina. «Enlazador», «secuencia enlazadora», «espaciador», «secuencia de anclaje» o equivalentes gramaticales de estos, en la presente se refieren a una molécula o grupo de moléculas (como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los enlazadores homo o hetero-bifuncionales también son conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica acerca de reticuladores, páginas 155-200). Se puede usar una cantidad de estrategias para unir moléculas covalentemente entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a, enlaces de polipéptidos entre los extremos N y C de proteínas y dominios de proteínas, enlace mediante enlace disulfuro y enlace mediante reactivos de reticulación química. En un caso, el enlazador es una unión peptídica, generada por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debería tener una longitud que es adecuada para enlazar dos moléculas de modo tal que asuman la conformación correcta una respecto de la otra de modo que retengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas a estos efectos incluyen residuos de al menos uno y no más de 50 aminoácidos. De manera adecuada, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud, p. ej., un enlazador puede tener 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (inclusive, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:1), (GGGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:2), y (GGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:3), en donde n es un entero de al menos uno), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como lo comprenderán los expertos en la técnica. De manera alternativa, una variedad de polímeros no proteínicos que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden ser útiles como enlazadores.

Producción de moléculas de coadhesión

También se describen en la presente métodos para producir y evaluar experimentalmente las moléculas de coadhesión. Los métodos descritos no pretenden limitar los casos a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Por el contrario, los métodos proporcionados pretenden ilustrar generalmente que una o más inmunoglobulinas se pueden producir y evaluar experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales para la biología molecular de anticuerpo, expresión, purificación y tamizaje 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* por Harlow & Lane, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En un caso descrito en la presente, se crean ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coadhesión y que luego se pueden clonar en células hospedadoras, expresarse y ensayarse, si se desea. Por lo tanto, se pueden hacer ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifican cada secuencia de proteína. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden ser útiles en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3ª ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como lo comprenderán los expertos en la técnica, la generación de secuencias exactas para una librería que comprende una gran cantidad de secuencias es potencialmente expansiva y consume mucho tiempo. «Biblioteca» en la presente se refiere a un conjunto de variantes en cualquier forma lo que incluye, pero sin limitarse a, una lista de secuencias de ácido nucleico o aminoácido, una lista de sustituciones de ácido nucleico o aminoácidos en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de biblioteca o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes, en forma purificada o no purificada. Por consiguiente, hay una variedad de técnicas que se pueden usar para generar bibliotecas descritas en la presente de manera eficaz. Estos

métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de ensamblaje genético, método basado en PCR y métodos que usan variaciones de PCR, métodos a base de reacción en cadena de ligasa, métodos oligo agrupados como los usados en transposición sintética, métodos de amplificación propensos al error y métodos que usan oligos con mutaciones aleatorias, métodos clásicos de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de casete y otros métodos de amplificación y síntesis genética. Como se conoce en la técnica, hay una variedad de kits comercialmente disponibles y métodos para ensamblaje genético, mutagénesis, subclonación de vectores y similares, y tales productos comerciales encuentran uso para generar ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

Las moléculas de cohesión descritas en la presente se pueden producir cultivando una célula hospedadora transformada con ácido nucleico, p. ej., un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las moléculas de cohesión, en las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula hospedadora y se determinarán fácilmente por un experto en la técnica mediante experimentación de rutina. Se pueda usar una amplia variedad de células hospedadoras apropiadas que incluye, pero no se limita a, células de mamíferos, bacterias, células de insectos y levadura. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden ser útiles en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC® disponibles de la Colección americana de cultivo tipo.

En una realización, las moléculas de cohesión se expresan en sistemas de expresión de mamíferos que incluyen sistemas en los que las construcciones de expresión se introducen en las células de mamífero usando virus tales como el retrovirus o el adenovirus. Se puede cualquier célula de mamífero, p. ej., células de humano, ratón, rata, hámster y primate. Las células adecuadas también incluyen células de investigación que incluyen, pero no se limitan a, células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NSO y variantes de estas. En una realización alternativa, las proteínas de biblioteca se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana son muy conocidos en la técnica e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*. En las realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas se producen en células de insectos (p. ej. Sf21/Sf9, Trichoplusia ni Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (p. ej. *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). En una realización alternativa, las moléculas de cohesión se expresan in vitro usando sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de traducción in vitro derivados de células procariotas (p. ej. *E. coli*) y eucariotas (p. ej. germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y se pueden elegir en función de los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, tal como observarán los expertos en la técnica, se requiere la traducción in vitro para algunas tecnologías de expresión, por ejemplo, la expresión en ribosomas. Además, las inmunoglobulinas se pueden producir por métodos de síntesis química. Además, los sistemas de expresión transgénicos animales (p. ej., leche de vaca, oveja o cabra, huevo de gallina embrionado, larvas de insectos enteras, etc.) y vegetales (p. ej., maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.).

Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de cohesión descritas en la presente se pueden incorporar en un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos de autoreplicación o vectores que se integran en un genoma hospedador. Los vectores de expresión se construyen para ser compatible con el tipo de célula hospedadora. Por lo tanto, los vectores de expresión son útiles en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, los que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levadura y sistemas in vitro. Como se conoce en la técnica, hay una variedad de vectores de expresión disponibles, comercialmente o de otro modo, que son útiles para expresar las moléculas de cohesión descritas en la presente.

Los vectores de expresión típicamente comprenden una proteína unida operativamente con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier compañero de fusión y/o elemento adicional. «Unido operativamente» en la presente significa que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico reguladoras de la transcripción y la traducción unido operativamente al ácido nucleico que codifica la molécula de cohesión y son típicamente apropiados para la célula hospedadora usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción y secuencias potenciadoras o de activación. Como también se sabe en la técnica, los vectores de expresión típicamente contienen un marcador o gen de selección para permitir la selección de células hospedadoras transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son ampliamente conocidos en la técnica y variarán dependiendo de la célula hospedadora que se utilice.

Las moléculas de cohesión se pueden enlazar operativamente a un compañero de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, purificación, tamizaje, visualización y similares. Los compañeros de fusión se pueden enlazar a la secuencia de inmunoglobulina mediante secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora generalmente comprenderá una pequeña cantidad de aminoácidos, típicamente menos que diez, pese a que también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como lo comprenderá un experto en la técnica, cualquiera de una variedad de secuencias se puede usar como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señal que dirige la

inmunoglobulina y cualquier compañero de fusión asociado a una ubicación celular deseada o al medio extracelular. Como se conoce en la técnica, determinadas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína para secretarse en el medio de crecimiento o en el espacio periplasmático, ubicado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o tamizaje. Estos compañeros de fusión incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo H₆ y H₁₀ u otras etiquetas para usarse con sistemas de cromatografía de afinidad por iones de metal inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) (p. ej. columnas de afinidad Ni⁺²)), fusiones GST, fusiones MBP, etiqueta Strep, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA y etiquetas de epítipo que son dirigidas por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas flag y similares). Como se comprenderá un experto en la técnica, estas etiquetas pueden ser útiles para la purificación, para el tamizaje o ambos. Por ejemplo, una inmunoglobulina se puede purificar usando una etiqueta His inmovilizándola a una columna de afinidad Ni² y después de la purificación, la misma etiqueta His se puede usar para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta con Ni² para realizar un ensayo ELISA u otro ensayo de unión (como se describe a continuación). Un compañero de fusión puede permitir el uso de un método de selección para tamizar inmunoglobulinas (véase a continuación). Los compañeros de fusión que permiten una variedad de métodos de selección se conocen en la técnica. Por ejemplo, al fusionar los miembros de una biblioteca de inmunoglobulina a la proteína genética III, se puede emplear expresión en fagos (Kay et ál., Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et ál., 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Los compañeros de fusión pueden permitir etiquetar inmunoglobulinas. De manera alternativa, un compañero de fusión puede unirse a una secuencia específica en el vector de expresión, permitiendo que el compañero de fusión y la inmunoglobulina asociada se una covalentemente o no covalentemente al ácido nucleico que los codifica. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en las células hospedadoras se conocen en la técnica y variarán con la célula hospedadora usada. Las técnicas incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato en calcio, tratamiento de cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o en fagos, encapsulación de uno o más polinucleóticos en liposomas y microinyección directa del ADN en núcleos. En el caso de células de mamíferos, la transfección puede ser transitoria o estable.

En un caso, las moléculas de cohesión se purifican o aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de muchas maneras que los expertos en la técnica conocen. Los métodos de purificación estándares incluyen técnicas de cromatografía que incluyen intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, calibrado o filtración en gel, y la fase inversa, llevada a cabo a presión atmosférica o alta presión mediante sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación incluyen también las técnicas electroforéticas, inmunológicas, precipitación, diálisis y cromatoenfoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Como se conoce en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y a anticuerpos, y estas proteínas pueden ser útiles para la purificación de inmunoglobulina descritas en la presente. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Asimismo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpo, como lo hace el antígeno diana de anticuerpo. La purificación puede habilitarse a menudo mediante un compañero de fusión particular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden purificarse usando resina de glutatión si se utiliza una fusión GST, cromatografía de afinidad Ni² si se utiliza una etiqueta His o un anticuerpo anti-flag inmovilizado si se utiliza una etiqueta flag. Para tener una guía general en cuanto a las técnicas adecuadas de purificación, véase, por ejemplo, lo siguiente, que se incorpora completamente mediante referencia: Protein Purification: Principles and Practice, 3.^a ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará según el análisis o uso de las inmunoglobulinas. En algunos casos no es necesaria ninguna purificación. Por ejemplo, en un caso, si las inmunoglobulinas se secretan, el tamizaje se puede llevar a cabo directamente desde el medio. Como se conoce en la técnica, algunos métodos de selección no implican la purificación de proteínas. Por lo tanto, por ejemplo, si una biblioteca de inmunoglobulinas se hace en una biblioteca de expresión en fagos, la purificación de proteínas puede no hacerse.

Experimentación in vitro

Las moléculas de cohesión se pueden tamizar usando una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a los que usan ensayos *in vitro*, *in vivo* y ensayos basados en células y tecnologías de selección. Las tecnologías de tamizaje de alto rendimiento y automatización se pueden utilizar en los procedimientos de tamizaje. El tamizaje puede emplear el uso de un compañero de fusión o etiqueta. El uso de compañeros de fusión se discutió anteriormente. «Etiquetado» en la presente se refiere a que las inmunoglobulinas descritas en la presente tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un tamizaje. En general, las etiquetas pueden estar en una de tres clases: a) etiquetas inmunes, que pueden ser un epítipo incorporado como compañero de fusión que se reconoce por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados y c) etiquetas de moléculas pequeñas, que pueden incluir tintes fluorescentes y colorimétricos o moléculas como biotina que permite otros métodos de etiquetado. Las etiquetas se pueden incorporar en el compuesto en cualquier posición y se pueden incorporar in vitro o in vivo durante la expresión de proteínas.

De manera adecuada, las propiedades funcionales y/o biofísicas de moléculas de cohesión se tamizan en un ensayo *in vitro*. Los ensayos in vitro pueden permitir un intervalo dinámico amplio de propiedades de tamizaje de interés. Las propiedades que se pueden tamizar incluyen, pero no se limitan a, estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos Fc, por ejemplo, FcγR. Se pueden tamizar múltiples proteínas simultáneamente o individualmente. Las proteínas pueden estar purificadas o no purificadas, dependiendo de los requisitos del ensayo. De manera adecuada, el tamizaje es un

ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para unir las moléculas de cohesión a una molécula de proteína o no proteína que se sabe o se cree que une la molécula de cohesión. De manera adecuada, el tamizaje es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. De manera adecuada, el tamizaje es un ensayo para unir las moléculas de cohesión a un ligando Fc que incluyen, pero no se limitan a la familia de FcγR, el receptor neonatal FcRn, la proteína de complemento C1q y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos pueden ser de cualquier organismo. De manera adecuada, los ligandos Fc son de seres humanos, ratones, ratas, conejos y/o monos. Se pueden realizar ensayos de unión usando una variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a ensayos basados en FRET (transferencia de energía de resonancia fluorescente) y BRET (transferencia de energía de resonancia bioluminiscente), AlphaScreen™ (Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminescente Amplificado), ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas), SPR (resonancia de plasmones superficiales, también denominado BIACORE®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel y cromatografía inclusive filtración de gel. Estos y otros métodos pueden tomar ventaja de algún compañero de fusión o etiqueta de la inmunoglobulina. Los ensayos pueden utilizar una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminescentes o isotópicas.

Las propiedades biofísicas de moléculas de cohesión, por ejemplo, estabilidad y solubilidad, se pueden evaluar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de proteína se puede determinar midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y no plegado. Por ejemplo, las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden desplegarse usando desnaturizante químico, calor o pH, y esta transición se puede monitorear usando métodos que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbanza, espectroscopía de NMR, calorimetría y proteólisis. Como los comprenderán los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos de las transiciones de plegado y desplegado también se pueden monitorear usando estas y otras técnicas. La solubilidad e integridad estructural global de la molécula de cohesión se puede determinar cuantitativa o cualitativamente usando un amplio rango de métodos conocidos en la técnica. Los métodos que pueden ser útiles para caracterizar las propiedades biofísicas de las moléculas de cohesión descritas en la presente incluyen electroforesis en gel, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar, cromatografía como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de iones y cromatografía líquida de alto rendimiento y fase inversa, mapeo peptídico, mapeo de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbanza ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, ultracentrifugación analítica, barrido de luz dinámica, proteólisis y reticulación, medición de turbidez, ensayos de retardo de filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión a tinte fluorescente, ensayos de tinción de proteína, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. El análisis estructural que emplea técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de NMR también puede ser útil. En un caso, la estabilidad y/o solubilidad se puede medir determinando la cantidad de solución de proteína después de algún período definido de tiempo. En este ensayo, la proteína puede o no exponerse a alguna condición extrema, por ejemplo, temperatura elevada, pH bajo o presencia de desnaturizante. Debido a que la función típicamente requiere una proteína estable, soluble y/o bien plegada/estructurada, los ensayos de unión y funcionales que anteceden también proporcionan formas de realizar tal medición. Por ejemplo, una solución que comprende una inmunoglobulina se podría someter a ensayo para determinar su capacidad de unirse a un antígeno diana, luego exponerse a temperatura elevada por uno o más períodos de tiempo definidos, luego someterse a ensayo para determinar la unión al antígeno nuevamente. Debido a que no se espera que la proteína no plegada y agregada sea capaz de unirse a un antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medición de la estabilidad y solubilidad de la molécula de cohesión.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión se pueden evaluar usando uno o más ensayos basados en células o *in vitro*. Para estos ensayos, las inmunoglobulinas, purificadas o no purificadas, se agregan típicamente de manera exógena de modo que las células se expongan a variantes individuales o grupos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan típicamente, pero no siempre, en la biología de la capacidad de la inmunoglobulina de unirse al antígeno diana y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo, funciones efectoras como lisis celular, fagocitosis, inhibición de unión al ligando/receptor, inhibición de crecimiento y/o proliferación, apoptosis y similares. Estos ensayos frecuentemente implican el monitoreo de la respuesta de las células a inmunoglobulina, por ejemplo, supervivencia celular, muerte celular, fagocitosis celular, lisis celular, cambio en la morfología celular o activación transcripcional como expresión celular de un gen natural o gen indicador. Por ejemplo, estos ensayos pueden medir la capacidad de moléculas de cohesión de provocar ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesario agregar células o componentes adicionales, es decir además de las células diana, por ejemplo, complemento sérico o células efectoras como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares. Estas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, p. ej., seres humanos, ratones, ratas, conejos y mono. Los anticuerpos reticulados o monoméricos pueden provocar apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan el antígeno diana del anticuerpo o pueden mediar el ataque a las células diana por células inmunes que se agregaron al ensayo. Los métodos para monitorear la muerte o viabilidad celular se conocen en la técnica e incluyen el uso de tintas, fluoróforos, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, ensayos de caspasa o conjugados de anexina y flúor pueden permitir medir la apoptosis y la absorción o liberación de sustancias radiactivas (p. ej., ensayos de liberación de cromo-51) o la reducción metabólica de tintes fluorescentes como azul alamar puede permitir monitorear el crecimiento, proliferación o activación celular. En un caso, se usa el ensayo de citotoxicidad a base de EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA). De manera alternativa, las células diana muertas o dañadas se pueden monitorear midiendo 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 ensayos basados en células. En este caso, la respuesta se puede monitorear sometiendo a ensayo los genes naturales o proteínas que se pueden regular por aumento o por disminución, por ejemplo, se puede medir la liberación de determinadas interleucinas o alternativamente la lectura puede ser mediante una construcción de indicador de luciferasa o GFP. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medición de cambios morfológicos de células en respuesta a la presencia de una inmunoglobulina. Los tipos de células para estos ensayos pueden ser procariontas o eucariotas y se puede emplear una variedad de líneas celulares que se conocen en la técnica. De manera alternativa, los tamizajes basados en células se realizan usando células que se transformaron o transfectaron con ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coadhesión.

Los ensayos *in vitro* incluyen, pero no se limitan a, ensayos de unión, ADCC, CDC, citotoxicidad, proliferación, liberación e peróxido/ozono, quimiotaxis de células efectoras, inhibición de tales ensayos por anticuerpos con menor función efectora; rangos de actividades como >100x de mejora o >100x de reducción, mezclas de activación de receptor y los resultados del ensayo que se esperan de tales perfiles de receptor.

Experimentación in vivo

Las propiedades biológicas de las moléculas de coadhesión descritas en la presente pueden caracterizarse en experimentos de células, tejido y organismos enteros. Como es sabido en la técnica, los fármacos se evalúan frecuentemente en animales lo que incluye, pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad u otras propiedades de un fármaco. Se puede hacer referencia a estos animales como modelos de enfermedad. Respecto de las moléculas de coadhesión descritas en la presente, un desafío particular surge al usar modelos animales para evaluar el potencial de la eficacia en seres humanos de los polipéptidos candidatos; esto se debe, al menos en parte, al hecho de que las moléculas de coadhesión que tienen un efecto específico en la afinidad de un receptor Fc humano pueden no tener un efecto de afinidad similar con el receptor de animal ortólogo. Estos problemas se pueden exacerbar más por las inevitables ambigüedades asociadas con la asignación correcta de ortólogos verdaderos (Mechetina et ál., Immunogenetics, 2002 54:463-468) y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal (p. ej., los seres humanos poseen un FcγRIIIa mientras que los ratones no). Los productos terapéuticos se evalúan frecuentemente en ratones que incluyen, pero sin limitarse a cepas de ratones NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y transgénicos (lo que incluye inactivaciones y activaciones). Estos ratones pueden desarrollar varias condiciones autoinmunes que se asemejan al órgano humano, patologías específicas de enfermedad inflamatoria o autoinmune sistémica como lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, una inmunoglobulina descrita en la presente deseada para enfermedades autoinmunitarias puede evaluarse en tales modelos de ratón al tratar los ratones para determinar la capacidad de la inmunoglobulina de reducir o inhibir el desarrollo de la patología de la enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el sistema de receptor Fcγ de ratón y humano, un enfoque alternativo es usar un modelo SCID murino en el que los ratones deficientes inmunes se injertan con PBL o PBMC humanas (huPBL- SCID, huPBMC-SCID) proporcionando un sistema inmune humano semifuncional con las células efectoras humanas y receptores Fc. En tal modelo, un desafío de antígeno (como toxoide tetánico) activa las células B para diferenciarlas en células plasmáticas y secretar inmunoglobulinas, reconstituyendo así la inmunidad humoral específica de antígeno. Por lo tanto, una inmunoglobulina de direccionamiento doble descrita en la presente que se une específicamente a IgE y FcγRIIIb en células B se puede evaluar para examinar la capacidad de inhibir específicamente la diferenciación de células B. Esta experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha inmunoglobulina para usarse como producto terapéutico. Otros organismos, p. ej., mamíferos también se pueden usar para la evaluación. Por ejemplo, debido a su similitud genética a seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y por lo tanto se pueden usar para evaluar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoglobulinas descritas en la presente. Las pruebas de las inmunoglobulinas descritas en la presente en seres humanos son necesarias en última instancia para su aprobación como fármacos y por lo tanto por supuesto que estos experimentos se contemplan. Por lo tanto, las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden evaluar en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las moléculas de coadhesión descritas en la presente pueden conferir un rendimiento superior a los productos terapéuticos que contienen Fc en modelos animales o en seres humanos. Los perfiles de unión al receptor de tales inmunoglobulinas, como se describe en la presente memoria descriptiva pueden, por ejemplo, seleccionarse para aumentar la potencia de fármacos citotóxicos o para dirigirse a funciones efectoras específicas o células efectoras para mejorar la selectividad de la acción del fármaco. Además, se pueden seleccionar los perfiles de unión al receptor que pueden reducir alguna o todas las funciones efectoras reduciendo así los efectos laterales o la toxicidad de tal fármaco que contiene Fc. Por ejemplo, una inmunoglobulina con menor unión a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIIa se puede seleccionar para eliminar la mayoría de la función efectora mediada por células o una inmunoglobulina con menor unión a C1q se puede seleccionar para limitar las funciones efectoras mediadas por el complemento. En algunos contextos, estas funciones efectoras se conocen por tener potenciales efectos tóxicos. Por lo tanto, eliminarlos puede aumentar la seguridad del fármaco con Fc y tal mejor seguridad se puede caracterizar en modelos animales. En algunos contextos, estas funciones efectoras se conocen por mediar la actividad terapéutica deseada. Por lo tanto, mejorarla puede aumentar la actividad o potencia del fármaco con Fc y tal mejor actividad o potencia se puede caracterizar en modelos animales.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se pueden evaluar para determinar la eficacia en modelos animales pertinentes clínicamente de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos pertinentes incluyen varios animales transgénicos por antígenos o receptores específicos.

5 Los modelos transgénicos relevantes como los que expresan receptores Fc humanos (p. ej., CD32b) se podrían usar para evaluar y probar la eficacia de las inmunoglobulinas y fusiones Fc. La evaluación de las moléculas de cohesión por la introducción de genes humanos que median directa o indirectamente la función efectora en ratones u otros roedores puede permitir estudios fisiológicos de eficacia en trastornos autoinmunitarios y RA. Los receptores Fc humanos como FcγRIIb puede poseer polimorfismos como el del gen promotor (-343 de G a C) o dominio transmembrana del receptor 187 I o T que además permitiría la introducción de polimorfismos humanos específicos y combinaciones de estos en roedores. Los diversos estudios que implican FcR específicos de polimorfismos no se limitan a esta sección, sin embargo, abarcan todas las discusiones y aplicaciones de FcR en general como se especifica en la presente solicitud. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden conferir una actividad superior a los fármacos que contienen Fc en tales modelos transgénicos, en particular las variantes con perfiles de unión optimizados para la actividad mediada por FcγRIIb humano pueden mostrar actividad superior en ratones CD32b transgénicos. Mejoras similares en la eficacia en ratones transgénicos para los otros receptores Fc humanos, p. ej., FcγRIIa, FcγRI, etc., se puede observar para las moléculas de cohesión con perfiles de unión optimizados para los receptores respectivos. Los ratones transgénicos para múltiples receptores humanos mostrarían una mejor actividad para inmunoglobulina con perfiles de unión optimizados para los receptores múltiples correspondientes.

20 Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el uso de modelos animales para caracterizar la potencial eficacia de anticuerpos terapéuticos candidatos en un paciente humano, algunos polipéptidos variantes descritos en la presente pueden ser útiles como agentes para evaluar el potencial de la eficacia en seres humanos. Estas moléculas intermediarias pueden imitar, en el sistema animal, la biología de FcR y/o complemento de una inmunoglobulina humana candidata correspondiente. Esta imitación más probablemente se manifieste por afinidades de asociación relativas entre inmunoglobulinas específicas y receptores animales en contraste con humanos. Por ejemplo, si se usara un modelo de ratón para evaluar la potencial eficacia en seres humanos de una variante Fc que tiene menor afinidad por el FcγRIIb humano inhibitorio, una variante intermediaria apropiada tendría menor afinidad por FcγRII de ratón. También se debe destacar que las variantes Fc intermediarias se podrían crear en el contexto de una variante Fc humana, una variante Fc animal o ambas.

30 En una realización, la evaluación de las moléculas de cohesión puede incluir el estudio de la eficacia en primates (p. ej., modelo de mono cinomolgo) para facilitar la evaluación del agotamiento de células diana específicas que alojan el antígeno diana. Los modelos de primate adicionales incluyen, pero no se limitan al uso del mono rhesus para evaluar los polipéptidos Fc en estudios terapéuticos de enfermedades autoinmunitarias, trasplantes y cáncer.

35 Los estudios de toxicidad realizan para determinar los efectos relacionados con el anticuerpo o fusión Fc que no se pueden evaluar en perfiles de farmacología estándar o que ocurren solo después de la administración repetida del agente. La mayoría de las pruebas de toxicidad se realizan en dos especies, un roedor y un no roedor, para asegurarse de no pasarse por alto ningún efecto adverso inesperado antes de que las nuevas entidades terapéuticas se introduzcan al hombre. En general, estos modelos pueden medir una variedad de toxicidades que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductiva/de desarrollo y carcinogenicidad. Dentro de los parámetros que anteceden se incluyen la medición estándar del consumo de alimentos, peso corporal, formación de anticuerpos, química clínica y examinación macro y microscópica de órganos/tejidos estándar (p. ej., cardiotoxicidad). Parámetros adicionales de medición son traumatismo en el sitio de inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si existen. Tradicionalmente, los productos terapéuticos de anticuerpo monoclonal, desnudo o conjugado, se evalúan para la reactividad cruzada con tejidos normales, producción de inmunogenicidad/anticuerpo, toxicidad de conjugado o enlazador y toxicidad «de espectador» de especies radiomarcadas. Sin embargo, estos estudios pueden tener que individualizarse para abordar preocupaciones específicas y siguiendo las directrices establecidas por ICH S6 (estudios de seguridad de productos biotecnológicos, también descrito anteriormente) Como tal, los principios generales son que los productos están lo suficientemente bien caracterizados, se retiraron las impurezas/contaminantes, que el material de prueba se puede comparar a través del desarrollo, que el cumplimiento con GLP se mantiene.

50 La farmacocinética (PK, por sus siglas en inglés) de las moléculas de cohesión descritas en la presente se puede estudiar en una variedad de sistemas animales, donde los más relevantes son los primates no humanos como los monos cinomolgo y rhesus. Las administraciones i.v./s.c. únicas o repetidas a lo largo de un rango de dosis de 6000 veces (0,05-300 mg/kg) puede evaluarse para la semivida (días a semanas) usando la concentración plasmática y depuración. El volumen de distribución en estado estacionario y el nivel de absorción sistémica también se pueden medir. Ejemplos de estos parámetros de medición incluyen generalmente la concentración en plasma máxima observada (C_{máx}), el tiempo para alcanzar la C_{máx} (T_{máx}), el área bajo la curva de concentración y tiempo en plasma desde tiempo 0 a la infinidad [AUC(0-inf)] y la semivida de eliminación aparente (T_{1/2}). Otros parámetros medidos podrían incluir análisis compartimental de datos de concentración y tiempo obtenidos después de la administración i.v. y la biodisponibilidad.

60 Las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden conferir farmacocinética superior a los productos terapéuticos que contienen Fc en sistemas animales o en seres humanos. Por ejemplo, una mayor unión a FcRn

puede aumentar la semivida y exposición del fármaco que contiene Fc. De manera alternativa, una menor unión a FcRn puede reducir la semivida y exposición del fármaco que contiene Fc en casos en que la exposición reducida es favorable tal como los casos en que tal fármaco tiene efectos secundarios.

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

10 Los estudios de farmacodinámica pueden incluir, pero no se limitan a, el direccionamiento de células específicas o el bloqueo de mecanismos de señalización, medir la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno, etc. Las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden dirigirse a poblaciones de células efectoras particulares y así dirigir los fármacos que contienen Fc a inducir determinadas actividades para mejorar la potencia o aumentar la penetración en un compartimento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad neutrófila y localización puede dirigirse mediante una molécula de cohesión que dirige FcγRIIIb. Dichos efectos farmacodinámicos se pueden demostrar en modelos de animales o en humanos.

Uso

20 Una vez hechas, las moléculas de cohesión como se describe en la presente encuentran utilidad en una variedad de métodos. De manera adecuada, el método incluye poner en contacto una célula que coexpresa IgE y FcγRIIb con una molécula de cohesión de modo que tanto IgE como FcγRIIb estén unidos por la molécula de cohesión y la célula se inhiba. «Inhibir» en este contexto se refiere a que la molécula de cohesión evita o reduce la activación y/o proliferación de células B IgE+.

25 Las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden encontrar utilidad en un amplio rango de productos. De manera adecuada, una molécula de cohesión descrita en la presente es un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación. La molécula de cohesión puede encontrar utilidad en una composición que es monoclonal o policlonal. Las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden usarse con fines terapéuticos. Como lo comprenderán los expertos en la técnica, las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden usarse con cualquier fin terapéutico para el que los anticuerpos y similares se pueden usar. Las moléculas de cohesión se pueden administrar a un paciente para tratar trastornos que incluyen, pero sin limitarse a, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades infecciosas y cáncer.

30 Un «paciente» a los efectos descritos en la presente incluye seres humanos y otros animales, p. ej., otros mamíferos. Por lo tanto, las moléculas de cohesión descritas en la presente tienen aplicaciones tanto en terapia de seres humanos como veterinaria. El término «tratamiento» o «tratar» como se describe en la presente pretende incluir tratamiento terapéutico, así como profiláctico, o medidas supresoras para una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, por ejemplo, la administración exitosa de una molécula de cohesión antes del inicio de la enfermedad resulta en el tratamiento de la enfermedad. A modo de otro ejemplo, la administración exitosa de una molécula de cohesión 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» también abarcan la administración de una inmunoglobulina optimizada después de la aparición de la enfermedad para erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un agente después del inicio y después de que se desarrollaron los síntomas clínicos, con posible remisión de los síntomas clínicos y tal vez mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos «que necesitan tratamiento» incluyen mamíferos que ya presentan la afección o el trastorno, así como a aquellos propensos a presentar la enfermedad o afección, inclusive aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad o afección.

45 De manera adecuada, una molécula de cohesión descrita en la presente se administra a un paciente que tiene una enfermedad que implica la expresión inadecuada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance descrito en la presente esto incluye enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes debido, por ejemplo, a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, localización de proteína, modificación postraducciona, estado de conformación, la presencia de una proteína mutante o patogénica, etc. De manera similar, la enfermedad o trastorno se puede caracterizar por moléculas de alteración que incluyen, pero sin limitarse a, polisacáridos y gangliósidos. Una sobreabundancia puede deberse a cualquier causa que incluye, pero sin limitarse a, sobreexpresión a nivel molecular, aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción o mayor actividad de una proteína respecto de lo normal. En esta definición se incluyen enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción de una proteína. Esta reducción puede deberse a cualquier causa que incluye, pero sin limitarse a, expresión reducida a nivel molecular, aparición acortada o reducida en el sitio de acción, formas mutantes de una proteína o menor actividad de una proteína respecto de lo normal. Esta sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse respecto de la expresión, aparición o actividad normal de una proteína, y dicha medición puede tener un papel importante en el desarrollo y/o la evaluación clínica de las inmunoglobulinas descritas en la presente.

En la presente se describen métodos novedosos para tratar trastornos mediados por IgE, p. ej., alergias a los alimentos

- y ambientales y asma alérgica. En una realización, la enfermedad alérgica que se puede tratar por medio de la invención es el asma alérgica. La memoria descriptiva describe también que las enfermedades alérgicas que se pueden tratar por medio de productos y métodos de la invención incluyen asma alérgico y atópico, dermatitis atópica y eczema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomielitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica y choque anafiláctico. Las alergias ambientales y a los alimentos que se pueden tratar incluyen alergias al ácaro del polvo, cucaracha, gato y otros animales, polen (inclusive ambrosía, gramíneas de Bermuda, cardo de Rusia, roble, centeno y otros), mohos y hongos (p. ej., *Alternaria alternata*, *Aspergillus* y otros), látex, picaduras de insectos (abeja, avispa y otros), penicilina y otras drogas, frutillas y otras frutas y vegetales, maní, soja y otras legumbres, nuez y otras nueces de árboles, crustáceos y otros mariscos, leche y otros productos lácteos, trigo y otros granos y huevos. De hecho, cualquier alérgeno de alimentos, aeroalérgeno, alérgeno ocupacional u otro alérgeno ambiental mediado por IgE se puede tratar por medio de una cantidad terapéutica de los productos descritos en la presente memoria descriptiva. Por ejemplos de alérgenos comunes, véase Arbes et ál., *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).
- También se describen pruebas de diagnóstico para identificar pacientes que probablemente muestren una respuesta clínica favorable a una molécula de cohesión descrita en la presente o que probablemente presenten una respuesta considerablemente mejor cuando se tratan con una molécula de cohesión descrita en la presente en contraste con uno o más productos terapéuticos usados actualmente. Se puede usar cualquiera de una cantidad de métodos conocidos en la técnica para determinar polimorfismos de FcγR en seres humanos. Además, también se describen pruebas de diagnóstico realizadas en muestras clínicas como muestras de sangre y tejido. Estas pruebas pueden estudiar la actividad, independientemente del mecanismo. Esta información se puede usar para identificar pacientes para la inclusión o exclusión en pruebas clínicas o para informar decisiones respecto de las dosificaciones y regímenes de tratamiento apropiados. Tal información también se puede usar para seleccionar un fármaco que contiene una molécula de cohesión particular que muestra actividad superior en tal ensayo.
- ### Formulación
- Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formula una molécula de cohesión descrita en la presente y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las moléculas de cohesión descritas en la presente se preparan para almacenarse mezclando dicha inmunoglobulina con el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios en las dosificaciones y las concentraciones empleadas e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico; alquilparabenos, tales como metilo o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; endulzantes y otros agentes saborizantes; rellenos como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En un caso, la composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina descrita en la presente puede estar en forma soluble en agua, tal como presente como sales farmacéuticamente aceptables, que pretende incluir tanto sales de adición de ácido como de base. «Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable» hace referencia a aquellas sales que mantienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otro modo indeseables, formadas con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos 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-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las «sales de adición de base farmacéuticamente aceptables» incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Algunos casos incluyen al menos una de sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales que derivan de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.
- Las moléculas de cohesión descritas en la presente también pueden formularse como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para administrar un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan por métodos conocidos en la técnica. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación bicapa,

similar a la disposición lipídica de las membranas biológicas. Es posible generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros con un tamaño de poros definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

5 La molécula de cohesión y otros agentes terapéuticamente activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen, pero no se limitan a, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina o microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., ed., 1980. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímero hidrofóbico sólido, donde dichas matrices están en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Algunos ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o alcohol polivinílico), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido glicólico-ácido láctico como Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico y ProLease® (comercialmente disponible de Akermes), que es un sistema de administración a base de microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólido (PLG).

20 Administración

La administración de la composición farmacéutica que comprende una molécula de cohesión descrita en la presente, p. ej., en la forma de una solución acuosa estéril, se puede lograr de varios modos que incluyen, pero sin limitarse a, administración oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraaórtica, transdérmica, tópica (p. ej., geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la inmunoglobulina se puede aplicar directamente como una solución o spray. Como se sabe en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse conforme a esto dependiendo de la manera de introducción.

La administración subcutánea se puede usar en circunstancias donde el paciente puede autoadministrarse la composición farmacéutica. Muchos productos terapéuticos de proteína no son lo suficientemente potentes como para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente eficaz en el volumen máximo aceptado para administración subcutánea. Este problema se puede abordar en parte por el uso de formulaciones de proteína que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser más adecuados para la administración subcutánea debido, por ejemplo, a una mayor potencia, mejor semivida en suero o mejor solubilidad.

Como se sabe en la técnica, los productos terapéuticos de proteína se administran generalmente por infusión IV o bolo. Los anticuerpos descritos en la presente también se pueden administrar usando estos métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con 0,9 % de cloruro de sodio como vehículo de infusión.

La administración pulmonar se puede lograr usando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de formación de aerosol. Por ejemplo, se puede usar la tecnología inhalable AERx® comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance™ comercialmente disponible de Nektar Therapeutics. Los anticuerpos descritos en la presente pueden ser más adecuados para la administración intrapulmonar. FcRn está presente en el pulmón y puede promover el transporte desde el pulmón al torrente sanguíneo (p. ej., Syntonix WO 04004798, Bitonti et ál. (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8). Por consiguiente, los anticuerpos que unen FcRn más eficazmente en el pulmón o que se liberan más eficazmente en el torrente sanguíneo pueden tener mejor biodisponibilidad después de la administración intrapulmonar. Los anticuerpos descritos en la presente también pueden ser más adecuados para la administración intrapulmonar debido, por ejemplo, a una mejor solubilidad o punto isoeléctrico alterado.

Además, las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden ser más adecuadas para la administración oral debido, por ejemplo, a una mejor estabilidad a pH gástrico y mayor resistencia a la proteólisis. Además, FcRn parece expresarse en el epitelio intestinal de adultos, de modo que los anticuerpos descritos en la presente con mejores perfiles de interacción de FcRn pueden mostrar una mejor biodisponibilidad después de la administración oral. El transporte de anticuerpos mediado por FcRn también puede ocurrir en otras membranas mucosas como las de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genital.

Además, cualquiera de una cantidad de sistemas de administración se conoce en la técnica y se pueden usar para administrar los anticuerpos descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (p. ej., microesferas PLA/PGA) y similares. De manera alternativa, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, inclusive membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material o matriz polimérica como poliésteres, hidrogeles, poli(vinilalcohol), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico como Lupron Depot® y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. También es 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 la locación de acción deseada o cerca de esta.

5 Dosificación

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración se seleccionan, en un caso, para ser terapéutica o profilácticamente eficaces. Como se sabe en la técnica, puede ser necesario hacer ajustes por degradación de proteína, administración sistémica versus localizada y la velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad, y se determinará mediante experimentación de rutina por los expertos en la técnica.

La concentración de la molécula de cohesión terapéuticamente eficaz en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100 % en peso. De manera adecuada, la concentración de la molécula de cohesión se encuentra en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Para tratar a un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina descrita en la presente. En la presente, «dosis terapéuticamente eficaz» se refiere a una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y será determinada por un experto en la técnica mediante técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo, 0,1, 1, 10, o 50 mg/kg de peso corporal. En un caso, las dosificaciones varían de 1 a 10 mg/kg.

De manera adecuada, solo se usa una dosis única de la molécula de cohesión. En otros casos, se administran múltiples dosis de la molécula de cohesión. El tiempo que pasa 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.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin períodos de reposo extendidos. Esta administración metronómica puede implicar dosificación en intervalos constantes sin períodos de reposo. Típicamente, estos regímenes abarcan infusión crónica de baja dosis o 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 menores puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de reposo.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales se administran cíclicamente al paciente. La terapia cíclica implica 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 reposo y luego repetir la secuencia de administración una o más veces. La cantidad 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

Las moléculas de cohesión descritas en la presente se pueden administrar concomitantemente con uno o más agentes o regímenes terapéuticos diferentes. Agentes o regímenes terapéuticos adicionales se pueden usar para tratar la misma enfermedad, para tratar una complicación que la acompaña o se pueden usar para mejorar la eficacia o seguridad de la inmunoglobulina.

Las coterapias particularmente preferidas incluyen las aprobadas o que están siendo evaluadas clínicamente para el tratamiento de trastornos mediados por IgE como alergias y asma. En particular, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden usar en combinación con antiinflamatorios como corticosteroides y/o broncodilatadores como agonistas β_2 inhalados, los dos grupos principales de medicaciones. Los corticosteroides inhalados incluyen fluticasona, budesonida, flunisolida, mometasona, triamcinolona y beclometasona, mientras que los corticosteroides orales incluyen prednisona, metilprednisolona y prednisolona. Otros esteroides incluyen glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, azulfidina eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, así como esteroides tópicos como antralina, calcipotrieno, clobetasol y tazaroteno. Los broncodilatadores aumentan el diámetro de los pasajes de aire y facilitan el flujo hacia y desde los pulmones. Los broncodilatadores que se pueden combinar con las terapias de la invención incluyen broncodilatadores de acción corta como metaproterenol, efedrina, terbutalina y albuterol y broncodilatadores de acción prolongada como salmeterol, metaproterenol y teofilina.

Las terapias de la invención se pueden combinar con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenac, etodolac, fenoprofeno, indometacina, ketoralac, oxaprozina, nabumentona, sulindac, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, ketoprofeno y nabumetona. Las coterapias pueden incluir antihistaminas como loratadina, fexofenadina, cetirizina, difenhidramina, clorfeniramina maleato, clemastina y azelastina. La co-terapia puede incluir cromoglicato, cromolin sodio y nedrocromil, así como descongestivos, en spray u orales, como oximetazolina, fenilefrina y pseudoefedrina. Las terapias de la invención se pueden combinar con una clase de

antiinflamatorios denominados antagonistas del receptor de leucotrienos como pranlukast, zafirlukast y montelukast e inhibidores de la síntesis del receptor de leucotrieno como zileuton.

- Las terapias de la descripción se pueden combinar con otras inmunoterapias que incluyen vacunas antialérgicas, así como otros antagonistas de IgE o FcεR. Las terapias de la descripción se pueden combinar con antagonistas de quimiocinas o citocinas, lo que incluye, pero sin limitarse a anticuerpos y fusiones Fc, lo que incluye, pero sin limitarse a inhibidores de quimiocinas CCR3, CCR4, CCR8 y CRTH2 y CCR5, e inhibidores de citocinas IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL15, IL-18, IL-19, IL-21, familia de clase II de receptores de citocina IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31 e IL-33. Las terapias de la descripción se pueden combinar con moduladores de la adhesión, factores de transcripción y/o señalización intracelular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la invención se pueden combinar con moduladores de NF-κB, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFAT, supresores de la señalización de citocina (SOCS), receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR), cinasa MAP, p38 MAPK, JNK y receptores de fosfato de esfingosina I. Las terapias de la descripción se pueden administrar con tolilato suplatast, inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE4), bloqueadores del canal de calcio y moléculas tipo heparina. Las posibles coterapias de la descripción se describen en más detalle en Caramori et ál., 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3-S1-S6.
- Las terapias de la descripción también se pueden usar junto con uno o más antibióticos, agentes antifúngicos o agentes antivirales. Los anticuerpos descritos en la presente también se pueden combinar con otros regímenes terapéuticos como cirugía.

Ejemplos

- A continuación, se proporcionan ejemplos a efectos ilustrativos solamente. Estos ejemplos no pretenden limitar ninguna realización descrita en la presente a ninguna aplicación o teoría de operación particular.

Ejemplo 1. Nuevos métodos para inhibir las células IgE+ FcγRIIB

- La inmunoglobulina IgE es un iniciador central y propagador de respuesta alérgica en tejido afectado. IgE une el receptor de alta afinidad de IgE (FcεRI), un receptor clave implicado en manifestaciones alérgicas inmediatas que se expresa en una variedad de células efectoras, que incluye mastocitos, basófilos, eosinófilos, así como otros tipos de células. La reticulación de FcεRI por alérgeno de IgE en complejo inmune activa estas células, liberando mediadores químicos como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, que pueden llevar al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad tipo I. El anticuerpo monoclonal aprobado Omalizumab (Xolair) neutraliza IgE uniéndose a esta y bloqueando la adhesión con FcεR. Omalizumab reduce la IgE bioactiva a través del secuestro, atenuación de la cantidad de IgE específica de antígeno a la que puede unirse y sensibilización de los mastocitos y basófilos del tejido. Esta neutralización de IgE circulante libre, a su vez, lleva a una reducción de los síntomas de enfermedades alérgicas. Cabe destacar que los niveles de IgE en suero aumentan después del comienzo de la terapia debido a la formación del complejo de omalizumab e IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. Por consiguiente, este problema puede llevar a falsos negativos en pruebas de diagnóstico y por lo tanto los niveles de IgE se deben verificar de forma rutinaria.

- Un enfoque novedoso para dirigirse a la vía de IgE implica no solo bloquear la IgE circulante libre de adherirse a FcεR en células efectoras sino también dirigirse a la fuente de producción de IgE. IgE es secretada por células plasmáticas que producen IgE ubicadas en ganglios linfáticos que drenan el sitio de entrada al antígeno o localmente en los sitios de reacciones alérgicas. Las células plasmáticas que producen IgE se diferencian de las células B IgE+. El cambio de clase de células B a producción de IgE es inducido por dos señales separadas; ambas pueden ser proporcionadas por las células TH2.

- Hay dos formas de inmunoglobulinas: las secretadas y las ancladas a la membrana. La forma anclada a la membrana difiere de la forma secretada en que la primera tiene un péptido de anclaje a la membrana que se extiende desde el extremo C de la cadena pesada. La inmunoglobulina anclada a la membrana en las células B, también denominado complejo del receptor de células B (BCR), es crítica para las funciones de las células B. Puede transducir señales a las células B en reposo para que se diferencien en linfoblastos activados y células plasmáticas que secretan Ig.

- Las células B diferenciadas que expresan IgE anclada a la membrana, denominadas en la presente células B mIgE+, poseen un mecanismo natural de retroalimentación por regulación negativa, el receptor Fc inhibidor FcγRIIb. FcγRIIb se expresa en una variedad de células inmunitarias, que incluyen células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, donde cumple un rol importante en la regulación inmunitaria. En su rol normal en las células B, FcγRIIb sirve como mecanismo de retroalimentación para modular la activación de células B mediante el receptor de células B (BCR). La adhesión de BCR por antígeno en complejo inmune en células B maduras activa una cascada de señalización intracelular, inclusive movilización de calcio, que lleva a la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, debido a que se producen anticuerpos IgG con especificidad al antígeno, los complejos inmunes asociados (IC) pueden reticular el BCR con FcγRIIb, tras lo cual la activación de BCR es inhibida por la adhesión de FcγRIIb y vías de señalización intracelular asociadas que interfieren con las vías corriente abajo de la activación de BCR. La expresión de FcγRIIb en la superficie de células B mIgE+, que usan mIgE como su BCR, sirve como regulador negativo de estos tipos celulares.

Una estrategia novedosa para inhibir una enfermedad mediada por IgE, que se ilustra en la figura 1, es inhibir las

células B IgE⁺ (es decir, las células B que expresan IgE anclada a la membrana) mediante la cohesión de IgE anclada a la membrana y el receptor inhibitorio FcγRIIb. En células B a las que se les cambió la clase para expresar IgE, mIgE sirve como BCR (denominado en la presente mIgE BCR). Este enfoque potencialmente inhibiría el mecanismo biológico natural de la supresión mediada por complejo inmune de la activación de células B, evitando así la diferenciación en células plasmáticas que producen IgE. Las células plasmáticas que producen IgE residen en la médula ósea y probablemente tienen una vida de varias semanas a varios meses. Debido a que las nuevas células plasmáticas que secretan IgE atraviesan etapas de células B que expresan mIgE durante la diferenciación, si su generación es abrogada por la inhibición de sus precursores de células B mIgE⁺ con este tratamiento anti-IgE, las células plasmáticas existentes morirán en un período de semanas a meses y por lo tanto la producción de IgE también se reducirá gradualmente. Cabe destacar que la inhibición de las células B de memoria IgE⁺, que tienen mIgE, también se inhibirían por inmunoglobulinas anti-IgE que coadhieren FcγRIIb con alta afinidad. Si esto ocurre, la terapia puede tener un efecto de largo plazo en la enfermedad fundamental.

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

En condiciones fisiológicas, la unión del BCR con FcγRIIb y posterior supresión de las células B ocurre mediante complejos inmunes de IgG y antígeno cognado. La estrategia de diseño era reproducir este efecto usando un único anticuerpo de reticulación. La IgG humana se une a FcγRIIb con afinidad débil (mayor que 100 nM para IgG1) y la inhibición mediada por FcγRIIb ocurre en respuesta a los complejos inmunes, pero no la IgG monomérica. Se razonó que la alta afinidad a este receptor (menor que 100 nM) sería necesaria para la inhibición máxima de la activación de células B. Para mejorar la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE de la invención, la región Fc se modificó genéticamente con variantes que mejoran la unión a FcγRIIb. Se han descrito variantes Fc modificadas genéticamente que se unen a FcγRIIb con mejor afinidad con respecto a la IgG1 natural (US 2009-0136485 A1).

Las variantes se generaron originalmente en el contexto de un anticuerpo que se dirige al antígeno CD19, un componente regulador del complejo co-receptor BCR. La región Fv de este anticuerpo es una versión humanizada y madurada por afinidad del anticuerpo 4G7 y se denomina en la presente HuAM4G7. Los genes Fv de este anticuerpo se subclonaron en el vector de expresión de mamífero pTT5 (National Research Council Canada). Las mutaciones en el dominio Fc se introdujeron usando mutagénesis dirigida al sitio (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, TX). Además, se generaron variantes con inactivación de control con afinidad nula a los receptores Fc que comprenden las sustituciones G236R y L328R (G236R/L328R). Esta variante se denomina Fc-KO o inactivación de Fc. Las construcciones de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK293E para la expresión y los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

La proteína FcγRIIb recombinante humana para los estudios de unión se obtuvo de R&D Systems (Minneapolis, MN). Se obtuvieron proteínas receptoras de FcγRIIa y FcγRIIIa de codificación de la colección de genes de mamíferos (ATCC) y se subclonaron en vector pTT5 (National Research Council Canada) que contiene etiquetas 6X His. Las formas alélicas de los receptores (H131 y R131 para FcγRIIa y V158 y F158 para FcγRIIIa) se generaron usando mutagénesis QuikChange. Los vectores que codifican los receptores se transfectaron con células HEK293T y las proteínas se purificaron usando cromatografía de afinidad de níquel.

Las variantes se evaluaron para determinar la afinidad al receptor usando tecnología Biacore, también denominada Biacore en la presente, una tecnología basada en resonancia de plasmones superficiales (SPR) para estudiar las interacciones biomoleculares en tiempo real. Se realizaron mediciones de SPR usando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se generó un chip biosensor CM5 de proteína A/G (Pierce Biotechnology) (Biacore) usando un protocolo de acoplamiento a la amina principal estándar. Todas las mediciones se realizaron usando amortiguador HBS-EP (10 mM de HEPES pH 7,4, 0,15 M de NaCl, 3 mM de EDTA, 0,005 % vol/vol de tensioactivo P20, Biacore). Los anticuerpos a 20 nM o 50 nM en amortiguador HBS-EP se inmovilizaron en la superficie de proteína A/G y se inyectaron FcγRs. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró por inyección de amortiguador de glicina (10 mM, pH 1,5). Los datos se procesaron poniendo a cero el tiempo y la respuesta antes de la inyección de FcγR y restando las señales no específicas apropiadas (respuesta del canal de referencia e inyección del amortiguador en ejecución). Los análisis cinéticos se realizaron por ajuste global de datos de unión con un modelo de unión Langmuir 1:1 usando software BIAevaluation (Biacore).

Un conjunto representativo de sensogramas para la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes selectos a FcγRIIb se muestra en la figura 2. Las afinidades de todas las variantes e IgG1 WT (natural) a todos los FcγRs, obtenidas de ajustes de los datos de unión Biacore, se grafican en la figura 3 y se proporcionan numéricamente en la figura 4. Mientras que IgG1 Fc WT se une con FcγRIIb con afinidad mM ($K_D = 1,8 \mu\text{M}$ en la figura 4), una cantidad de variantes, por ejemplo, G236D/S267E, S239D/S267E y S267E/L328F se han modificado genéticamente que se unen al receptor inhibitorio más estrechamente. La variante S239D/I332E, como se describe en US 2006-0024298 A1, también tiene afinidad mejorada por los receptores de activación FcγRIIa y FcγRIIIa, y por lo tanto es capaz de citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC) mejorada y mediada y fagocitosis (ADCP). La variante G236R/L328R, también denominada inactivación de Fc o Fc-KO, no tiene unión a los receptores Fc y se usa como control en los experimentos descritos en la presente.

Se construyeron variantes selectas en anticuerpos que se dirigen a IgE. Las regiones variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) de anticuerpos anti-IgE se proporcionan en la figura 5. Omalizumab es un anticuerpo humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de asma alérgica y se comercializa con el nombre Xolair. MaE11 es el precursor murino de Omalizumab. H1L1_MaE11 es una versión humanizada novedosa de MaE11. Los genes que codifican los dominios VH y VL de cadena pesada y ligera de estos anticuerpos anti-IgE se sintetizaron comercialmente (Blue Heron Biotechnologies). También se sintetizaron los genes VH y VL de región variable del anticuerpo anti virus respiratorio sincitial (RSV, por sus siglas en inglés) motavizumab, usado en los experimentos descritos en la presente como control negativo. Los genes VL se subclonaron en el vector de expresión de mamífero pTT5 (NRC-BRI, Canadá) que codifica la cadena constante Ckappa. Los genes VH se subclonaron en el vector pTT5 que codifica la IgG1 natural y cadenas constantes variantes. Las secuencias de aminoácidos de cadenas constantes seleccionadas se proporcionan en la figura 6. Todo el ADN se secuenció para confirmar la fidelidad de las secuencias. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas, pesada y ligera de longitud completa de anticuerpos selectos se proporcionan en la figura 7.

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

Los anticuerpos anti-IgE de IgG1 variantes y naturales se evaluaron para determinar la unión a IgE y a FcγRIIb usando Biacore. El ADN que codifica la región Fc de IgE, que contiene el sitio de unión de los anticuerpos anti-IgE usados, se sintetizó (Blue Heron Biotechnologies) y se subclonó en el vector pTT5. Fc de IgE se expresó en células 293E y se purificó usando proteína A como se describe anteriormente. Las mediciones de SPR se realizaron usando el método de captura de proteína A/ anticuerpo descrito anteriormente, excepto que el analito era FcγRIIb o la región Fc del IgE. La adquisición y ajuste de datos se describen anteriormente. La figura 8 proporciona las constantes de unión de equilibrio (K_D s) resultantes obtenidas de estos experimentos de unión, así como la afinidad en veces con respecto a la IgG1 natural para unirse a FcγRIIb. La figura 9 muestra gráficas de estos datos. Los resultados confirman el máximo de afinidad de los anticuerpos para IgE y que la variante S267E/L328F mejora la unión a FcγRIIb por dos órdenes de magnitud, lo que es coherente con los resultados anteriores.

El uso de variantes particulares, por ejemplo, S267E/L328F y S239D/I332E, está destinado en la presente como prueba de concepto de los mecanismos como se describe en la presente y no pretende restringir la invención a su uso particular. Los datos suministrados en USSN 12/156,183 (US2009-0136485 A1) y USSN 11/124,620 (US2006-0024298 A1) indican que una cantidad de variantes modificadas genéticamente, en posiciones Fc específicas, proporcionan las propiedades deseadas. Las sustituciones para mejorar la afinidad de FcγR, en particular a FcγRIIb, incluyen: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332. De manera adecuada, las sustituciones se hacen al menos a una o más de las siguientes posiciones no taxativas para mejorar la afinidad a FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328.

Las combinaciones no taxativas de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a 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. De manera adecuada, las combinaciones de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328.

Las sustituciones para mejorar la afinidad a 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. De manera adecuada, la combinación de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a: 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y.

Las combinaciones de sustituciones para mejorar la afinidad a 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. En algunas realizaciones, las combinaciones de sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan 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 a FcγRIIb

Un ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA) se estableció para detectar IgE. Las placas de fondo plano se prepararon recubriendo con amortiguador de Nabicarbonato pH 9,4, seguido de adherencia con anticuerpos de captura

anti-IgE a 10 µg/ml durante la noche en pH 9,4 (0,1 M de amortiguador NaBicarbonato). Después de la noche, la placa se bloqueó con 3 % de BSA/PBS y diluciones en serie de IgE (de un kit ELISA de IgE humana, Bethyl Laboratories) se agregaron 3x a 1 µg/ml. Después de 3 horas, las placas se lavaron 3x (200 µl) con TTBS y se midió la Ige unida. El anticuerpo IgE antihumano policlonal de cabra conjugado con HRP (Bethyl Laboratories) se agregó a (1:5000) durante 1 hora en 1 % de BSA/PBS. Las muestras se lavaron 3x y el IgE se detectó con sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Inc 50-76-00). Las reacciones se detuvieron con 50 µl de H₂SO₄ 2N y se leyeron a 450 nm.

La figura 10 muestra la captura de la IgE con diversos anticuerpos de IgE anti-humanos que incluyen un conjunto de tres anticuerpos anti-IgE monoclonales (MabTech; 107/182/101), MaE11_IgG1_G236R/L328R, y Omalizumab_IgG1_G236R/L328R. Los datos muestran que el reactivo de anticuerpo anti-IgE comercial (MabTech), Omalizumab, y su anticuerpo MaE11 quimérico original pueden capturar la IgE. Para usar este ensayo para detectar IgE, fue necesario determinar si los anticuerpos MaE11 y omalizumab interferirían con la captura de IgE por reactivo anti-IgE MabTech. Este ensayo se repitió como se describe anteriormente y la concentración de IgE de absorbancia se calculó usando una curva estándar. La figura 11 muestra que el anticuerpo anti-IgE omalizumab_G236R/L328R no compite con el anticuerpo anti-IgE de MabTech en el protocolo ELISA actual.

Los anticuerpos anti-IgE de variante Fc se evaluaron para determinar su capacidad de inhibir células B IgE+. Las PBMC humanas se indujeron a cambio de clase a células B que producen IgE agregando 5 ng/ml de 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 por lo tanto imita la actividad del coactivador CD40L. Se agregaron varias concentraciones de anticuerpos anti-IgE y las muestras se incubaron durante 12 días. Las placas ELISA se prepararon y bloquearon como se describe anteriormente usando 5 µg/ml de anti-IgE Mabtech como anticuerpo de captura. 100 µl de las muestras de PBMC se agregaron e incubaron >3 horas y luego se lavaron con TTBS 3x (200 µl). El anticuerpo conjugado a HRP de anticuerpo se agregó y detectó como se describe anteriormente. La absorbancia a 450 nm se convirtió a concentración de IgE usando una curva estándar. Los resultados se muestran en la figura 12. Los anticuerpos que no tienen unión a FcγR (variantes G236R/L328R) o que no tienen especificidad por IgE (anticuerpo anti-RSV Motavizumab) no tuvieron efecto en la producción de IgE de las células B diferenciadas. Por el contrario, los anticuerpos variantes con mayor afinidad a FcγRIIb inhibieron la producción de IgE. Estos datos sugieren que la cohesión de IgE de superficie y el receptor de FcγR inhibidor FcγRIIb inhibe las células B de clase cambiada de ese tipo de inmunoglobulina. La inhibición de células B IgE+ reduce la cantidad de células plasmáticas que expresan IgE, que a su vez reducen la cantidad de IgE detectada. Para evaluar la selectividad de esta actividad por las células B que producen IgE, la IgG2 humana se midió para las mismas muestras usando un ELISA e IgG2 (Bethyl Laboratories). La figura 13 muestra que la secreción de IgG2 no se inhibió, lo que indica que la actividad inhibitoria de anticuerpos anti-IgE con alta afinidad para FcγRIIb es selectiva de las células de clase cambiada IgE+. La repetición de este experimento usando versiones variantes del anticuerpo anti-IgE aprobado Omalizumab mostró resultados inhibitorios similares por la variante con alta afinidad a FcγRIIb (figura 14).

La capacidad de anticuerpos anti-IgE con alta afinidad a FcγRIIb de inhibir la producción de IgE se evaluó en presencia de estimulación de BCR mIgE. El ensayo que antecede se repitió, con cambio de clase a IgE promovido por IL-4 y anticuerpo agonista α-CD40 y además las células B se activaron usando anticuerpo anti-mu o anti-CD79b. Estos anticuerpos reticulan el BCR, proporcionando así una señal similar al antígeno en complejo inmune. El anticuerpo anti-mu reticula IgM anclado a la membrana y anti-CD79b reticula Cd79b, que es un componente de señalización del complejo BCR. PBMC se incubaron durante 14 días con IL-4, α-CD40 y anti-CD79b o anti-mu y se detectó IgE como se describe anteriormente. Los resultados de anti-CD79b (figura 15) y anti-mu (figura 16) muestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad a FcγRIIb son capaces de inhibir la producción de IgE cuando las células B se estimulan mediante reticulación de BCR.

Una estrategia adicional para inhibir las células B IgE+ es vaciarlas. Esto se puede llevar a cabo usando un anticuerpo anti-IgE potenciado por función efectora. La variante S239D/I332E aumenta la unión al receptor de activación FcγRIIIa y FcγRIIIa (figura 3 y figura 4) y por lo tanto mejora las funciones efectoras de ADCC y ADCP. El ensayo de células B que antecede se realizó usando una variante S239D/I332E del anticuerpo anti-IgE Omalizumab. PBMC se incubaron durante 14 días con IL-4, α-CD40 y anti-CD79b (figura 17) o anti-mu (figura 18) y se detectó IgE como se describe anteriormente. Los resultados (figuras 17 y 18) muestran que los anticuerpos anti-IgE con función efectora optimizada pueden inhibir la producción de IgE de las células B IgE+ de clase cambiada.

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

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se evaluaron usando un modelo de ratón huPBL-SCID como un intermediario para la actividad terapéutica en seres humanos. Este estudio examinó la capacidad de los anticuerpos anti-IgE descritos en la presente de inhibir la actividad de las células B y el desarrollo de células plasmáticas en respuesta a un alérgeno humano común - proteína de ácaro del polvo Der p 1. En este método, los leucocitos de sangre periférica humana (PBL) de un donante de sangre con respuesta alérgica a Der p 1 se injertaron en ratones SCID con deficiencia inmunitaria y se trataron con los anticuerpos anti-IgE naturales o variantes. Los ratones se expusieron a un antígeno para estimular una respuesta inmunitaria y la producción de inmunoglobulinas se midió para examinar el curso del desarrollo de células B en células plasmáticas.

Los donantes de sangre se estudiaron para detectar alergia al antígeno del ácaro del polvo según la presencia de

anticuerpos anti-IgE contra Der p 1. Un donante con reactividad positiva se sometió a leucoféresis para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El protocolo del 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 µl de anticuerpo anti-asialo GM (Wako, Richmond, VA) para vaciar los linfocitos citolíticos (NK) de murino. Al día siguiente, los ratones se inyectaron i.p. 3×10^7 de PBL 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. El día 7 después de la inyección de PBMC, se recogió la sangre de todos los animales mediante punción retroorbital de seno/plexo (OSP) para la determinación de los niveles de IgG e IgE humana por ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dos días después (día 9), los ratones se inyectaron i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. El día 11, los ratones se inyectaron i.p. con 15 µg de antígeno de ácaro del polvo Der p 1 (LoTox Natural Der p 1, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA). El día 23 (12 días después de la vacunación con antígeno), se recogió sangre de todos los ratones para determinar los anticuerpos IgG e IgE humanos. El mismo día, los ratones recibieron una segunda inyección i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. Dos días después (día 25), los ratones recibieron una vacunación de refuerzo i.p. de 10 µg de antígeno de ácaro de polvo Der p 1. El día 37 (12 días después del refuerzo de antígeno), se recogió sangre por OSP para la determinación de inmunoglobulina humana. Las concentraciones de IgG e IgE humana se midieron usando métodos ELISA similares a los descritos anteriormente.

Los resultados se muestran en las figuras 20 y 21 para los niveles de IgG e IgE en suero, respectivamente. Antes de la exposición a alérgenos, 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 indica una respuesta inmunitaria sólida por células B de humano injertadas al antígeno Der p 1 vacunado o antígenos de ratón endógeno. En contraste a la respuesta de IgG, los grupos de tratamiento tenían leves diferencias en la producción de anticuerpos IgE. Omalizumab y la versión de IgG1 de H1L1 MaE11 eran equivalentes al vehículo en su capacidad de inhibir la producción de IgE humana. Sin embargo, la versión mejorada por FcγRIIb (IIbE, S267E/L328F) de H1L1 MaE11 no mostró niveles detectables de IgE humana. La versión Fc-KO (variante G236R/L328R) de H1L1 MaE11, que no tiene unión a todos los FcγR, mostró una mejora en la producción de IgE humana. Esto se debe posiblemente a su capacidad de reticular la mIgE humana y por lo tanto activar las células B de IgE+, pero su total falta de actividades inhibitorias de FcγRIIb o citotóxicas de FcγRIIa/IIIa como las que poseen las versiones de IgG1 e IIbE del anticuerpo. Estos datos in vivo muestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad a FcγRIIb pueden inhibir la activación de células B IgE+ humanas y la diferenciación de células plasmáticas que secretan inmunoglobulinas y por lo tanto soportan el potencial de las inmunoglobulinas descritas en la presente para tratar trastornos mediados por IgE.

La descripción incluye además la materia de las reivindicaciones de WO2010/033736 de la cual deriva la presente solicitud, cuyo contenido se reproduce más adelante como párrafos numerados.

Párrafo 1. Un método para inhibir una célula de IgE + FcγRIIb+ que comprende poner en contacto la célula con una molécula de cohesión, en donde dicha molécula de cohesión se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, y en donde dicha molécula de cohesión de cohiere la IgE y FcγRIIb en la superficie de la célula.

Párrafo 2. El método del párrafo 1, en donde dicha molécula de cohesión es un anticuerpo con especificidad para IgE.

Párrafo 3. El método del párrafo 1, en donde la molécula de cohesión es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv une IgE, y dicha segunda región Fv une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

Párrafo 4. El método del párrafo 1, en donde dicha molécula de cohesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

Párrafo 5. El método del párrafo 1, en donde la célula es una célula B.

Párrafo 6. Una molécula de cohesión que tiene especificidad para IgE, en donde dicha molécula de cohesión comprende una variante Fc de un polipéptido Fc original, en donde dicha variante Fc tiene una afinidad de unión mejorada a FcγRIIb con respecto al polipéptido Fc original.

Párrafo 7. La molécula de cohesión del párrafo 6, en donde dicha variante Fc comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc en comparación con un polipéptido Fc original, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste en 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 un índice EU.

Párrafo 8. La molécula de cohesión del párrafo 6, en donde dicha modificación es una sustitución que se selecciona del grupo que consiste en L235Y, G236D, S239D, V266M, S267E, H268D, H268E, L328F, L328W y L328Y 267D y 267E.

Párrafo 9. La molécula de cohesión del párrafo 8, en donde dicha modificación es una sustitución que se selecciona del grupo que consiste en 267D y 267E.

Párrafo 10. La molécula de cohesión del párrafo 9, que comprende además una sustitución que se selecciona del grupo que consiste en 328F, 325D, 325Y, 239D, 332E, 268D, 268E, 236D, 236N, 328W, 328Y, 234D, 234E, 234W, 237D, 237N, 327D, 327E, 235F, 235R, 239E y 266M, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU.

5 Párrafo 11. 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 se une a FcγRIIb con una Kd de inferior a aproximadamente 100 nM.

Párrafo 12. El anticuerpo del párrafo 11, en donde el dominio VH de la región variable comprende una CDR1 de la SEQ ID NO:2, una CDR2 de la SEQ ID NO:3 y una CDR3 de la SEQ ID NO:4 o una CDR1 de la SEQ ID NO: 18, una CDR2 de la SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de la SEQ ID NO:20.

10 Párrafo 13. El anticuerpo del párrafo 11, en donde el dominio VL de la región variable comprende una CDR1 de la SEQ ID NO:6, una CDR2 de la SEQ ID NO:7 y una CDR3 de la SEQ ID NO:8 o una CDR1 de la SEQ ID NO:22, una CDR2 de la SEQ ID NO:23 y una CDR3 de la SEQ ID NO:24.

Listado de secuencias

<110> Xencor, Inc. Desjarlais, John R. Chu, Seung Y Horton, Holly M.

15 <120> Nuevos Compuestos y Métodos para Tratar Trastornos Medrados por IgE

<130> 067461-5143-WO

<140> PCT/US2009/057366

<141> 17-09-2009

<150> US 61/097,819

20 <151> 17-09-2008

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 121

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Omalizumab VH Humanizado

<400> 1

ES 2 708 842 T3

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

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

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

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

<400> 2
 Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp
 1 5

10 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3
 Thr Tyr Asp Gly Ser
 1 5

15 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val
 1 5 10

20 <210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Omalizumab VL Humanizado

<400> 5

ES 2 708 842 T3

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

5 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
 1 5 10

10 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

15 <400> 7
 Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20 <400> 8
 Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

25 <210> 9
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 708 842 T3

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

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

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

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

Lys Asn Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

5 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp
1 5

10 <210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

15 <400> 11
Thr Tyr Asp Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

20 <400> 12
Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val
1 5 10

<210> 13
<211> 111
<212> PRT
25 <213> Mus musculus

<400> 13
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp

ES 2 708 842 T3

20

25

30

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 14

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

<210> 15

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser
 1 5

15 <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> H1L1MaE11 VH Humanizado

<400> 17

ES 2 708 842 T3

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

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

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

Ile Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
5 <213> Mus musculus

<400> 18
Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp
1 5

<210> 19
<211> 5
10 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 19
Thr Tyr Asp Gly Ser
1 5

<210> 20
<211> 12
15 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 20
Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val
1 5 10

<210> 21
<211> 111
<212> PRT
20 <213> Mus musculus

<400> 21

ES 2 708 842 T3

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

<400> 22
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
 1 5 10

10 <210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser
 1 5

15 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24
 Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 25
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 25

ES 2 708 842 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

Trp Leu Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Glu Ile Ser Pro Gly Thr Phe Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

<400> 26
 Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp
 1 5

<210> 27
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 27
 Ser Pro Gly Thr Phe Thr
 1 5

<210> 28
 <211> 14
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 28
 Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 107
 <212> PRT
 20 <213> Mus musculus

<400> 29

ES 2 708 842 T3

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 30

Gln Ser Ile Gly Thr Asn

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 31

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 32

Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr

1 5

20 <210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 33

ES 2 708 842 T3

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 34

ES 2 708 842 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

ES 2 708 842 T3

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 35

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante artificial de cadena constante S267E/L328F IgG1

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

10

ES 2 708 842 T3

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 36

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante artificial de cadena constante G236D/S267E IgG1

<400> 36

ES 2 708 842 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Asp Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

ES 2 708 842 T3

245

250

255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 37

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante Artificial de cadena ligera (VH-C) Omalizumab

<400> 37

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

10

ES 2 708 842 T3

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 38

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Variante artificial de cadena pesada IgG1 Omalizumab

<400> 38

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

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

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

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110

10

ES 2 708 842 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

ES 2 708 842 T3

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 39

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada Artificial S267E/L328F humanizado Omalizumab

<400> 39

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

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

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

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

10

ES 2 708 842 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His
 260 265 270

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

ES 2 708 842 T3

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 40

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera (VH-C) H1L1 MaE11 Artificial humanizado

<400> 40

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

10

ES 2 708 842 T3

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 41

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada H1L1 MaE11 IgG1 Artificial Humanizado

<400> 41

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

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

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

Ile Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10

ES 2 708 842 T3

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

ES 2 708 842 T3

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 42

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada H1L1 MaE11 S267E/L328F Artificial Humanizado

<400> 42

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

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

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

Ile Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

10

ES 2 708 842 T3

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

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

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His
 260 265 270

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

ES 2 708 842 T3

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 43

<211> 5

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> glicina-serina conector

<400> 43

gsggs 5

10 <210> 44

<211> 5

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> glicina-serina conector

<400> 44

ggggs 5

<210> 45

<211> 4

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> glicina-serina conector

<400> 45

25 ggggs 4

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo para usar en el tratamiento del asma alérgico en un sujeto que lo necesita, dicho anticuerpo comprende:

- a. una cadena pesada que tiene la SEQ ID NO:42; y
- b. una cadena ligera que tiene la SEQ ID NO:40.

5

Figura 1

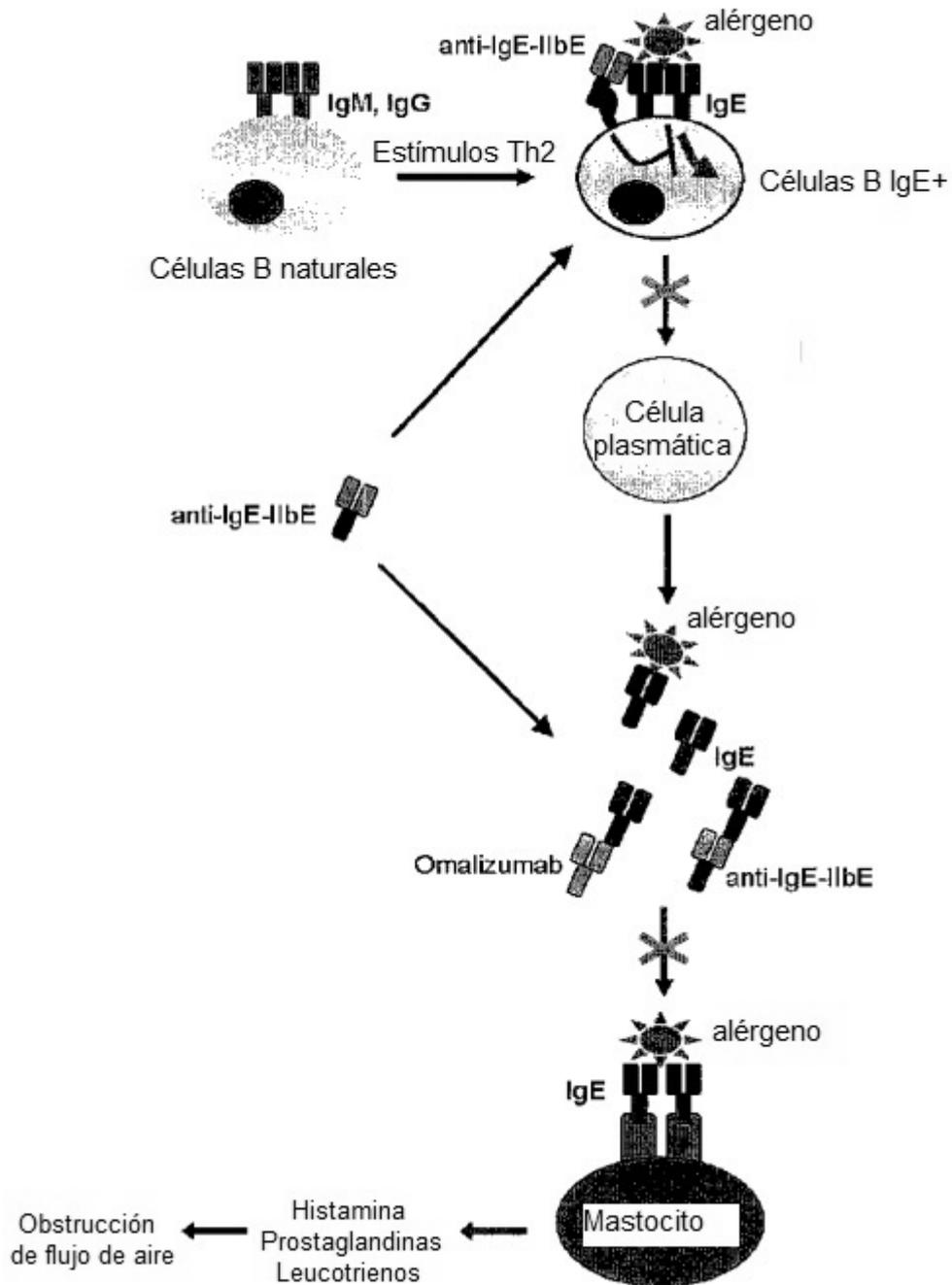


Figura 2

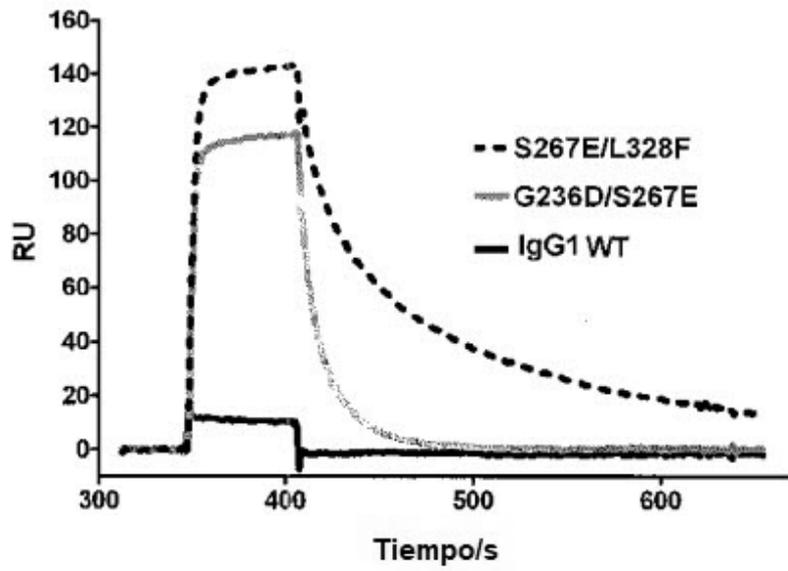


Figura 3

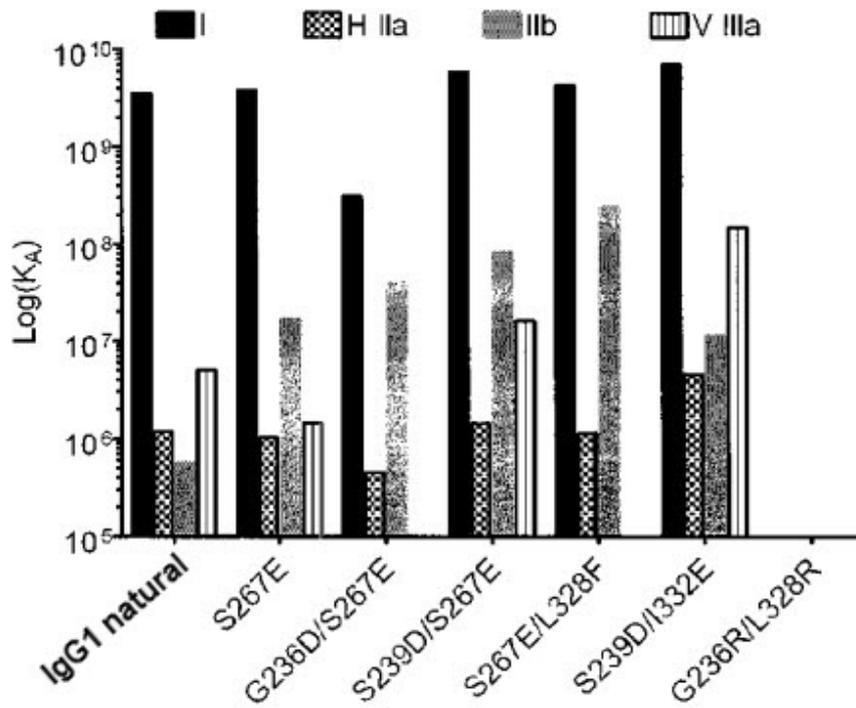


Figura 4

Anticuerpo	Fc γ RI		H131 Fc γ RIIa		Fc γ RIIb		V158 Fc γ RIIIa	
	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces	KD (M)	Veces
IgG1 natural	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 (SEQ ID NO:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTS
S

Omalizumab VH CDR1 (SEQ ID NO:2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEQ ID NO:3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEQ ID NO:4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEQ ID NO:5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEQ ID NO:6)

QSVVDYDGDSY

Omalizumab VL CDR2 (SEQ ID NO:7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEQ ID NO:8)

SHEDPYT

MaE11 VH (SEQ ID NO:9)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNY
NPSLKNRISVTRDTSQNFLLKLSATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTS
S

MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEQ ID NO:13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLGSEI
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:14)

QSVVDYDGDSY

MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:15)

AASYLGS

Figura 5 (continuación)

MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:16)

SHEDPYT

H1L1MaE11 VH (SEQ ID NO:17)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNMIRQPPGKKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRVTIS
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTVSS

H1L1 MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:18)

YSITSGYSW

H1L1 MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:19)

TYDGS

H1L1 MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:20)

GSHYFGHWHFVAV

H1L1 MaE11 VL (SEQ ID NO:21)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

H1L1 MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:22)

QSVVDYDGDSY

H1L1 MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:23)

AASYLGS

H1L1 MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:24)

SHEDPYT

TES-C21 VH (SEQ ID NO:25)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYTFSMYWLEWVKQRPGHGLEWVGEISPGTFTTN
YNEKFKAKATFTADTSSNTAYLQLSGLTSEDSAVYFCARFSHFSGSNYDYFDYWGQGTSLT
VSS

TES-C21 VH CDR1 (SEQ ID NO:26)

YTFSMYW

TES-C21 VH CDR2 (SEQ ID NO:27)

SPGTFT

TES-C21 VH CDR3 (SEQ ID NO:28)

FSHFSGSNYDYFDY

TES-C21 VL (SEQ ID NO:29)

DILLTQSPAILSVPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQQRDGGSPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTEFTLNINSVESEDIADYYCQQSDSWPTTFGGGKLEIK

TES-C21 VL CDR1 (SEQ ID NO:30)

QSIGTN

Figura 5 (continuación)

TES-C21 VL CDR2 (SEQ ID NO:31)

YASESIS

TES-C21 VL CDR3 (SEQ ID NO:32)

SDSWPTT

Figura 6

Cadena ligera Ckappa (SEQ ID NO:33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena constante IgG1 natural (SEQ ID NO:34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena constante IgG1 S267E/L328F (SEQ ID NO:35)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena constante IgG1 G236D/S267E (SEQ ID NO:36)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGP
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

Cadena ligera de Omalizumab (VH-Ck) (SEQ ID NO:37)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
 VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRFAKVKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada IgG1 de Omalizumab (SEQ ID NO:38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLWVASITYDGS
 TNYNPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHW HFAVWGQGLTVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKG FYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada S267E/L328F de Omalizumab (SEQ ID NO:39)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLWVASITYDGS
 TNYNPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHW HFAVWGQGLTVTS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
 NQVSLTCLVKG FYPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQG
 NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena ligera MaE11 H1L1 (VH-Ck) (SEQ ID NO:40)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
 IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRFAKVKVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada IgG1 MaE11 H1L1 (SEQ ID NO:41)

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGK KLEWIGSITYDGS
 SNYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHW HFAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPYSDIA
 VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

Cadena pesada S267E/L328F MaE11 H1L1 (SEQ ID NO:42)

QVQLQESGPGLVKPKSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGK KLEWIGSITYDGS
 SNYNP SLKSRVTISRDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHW HFAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS
 TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKAFPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPYSDIA
 VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

Figura 8

Anticuerpo	IgE KD (M)	FcγRIIb KD (M)	FcγRIIb Veces
Omalizumab_igG1_WT	2.2E-10	1.94E-06	1.0
Omalizumab_igG1_S267E/L328F	2.0E-10	1.4E-08	135
MaE11_H1L1_igG1_WT	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

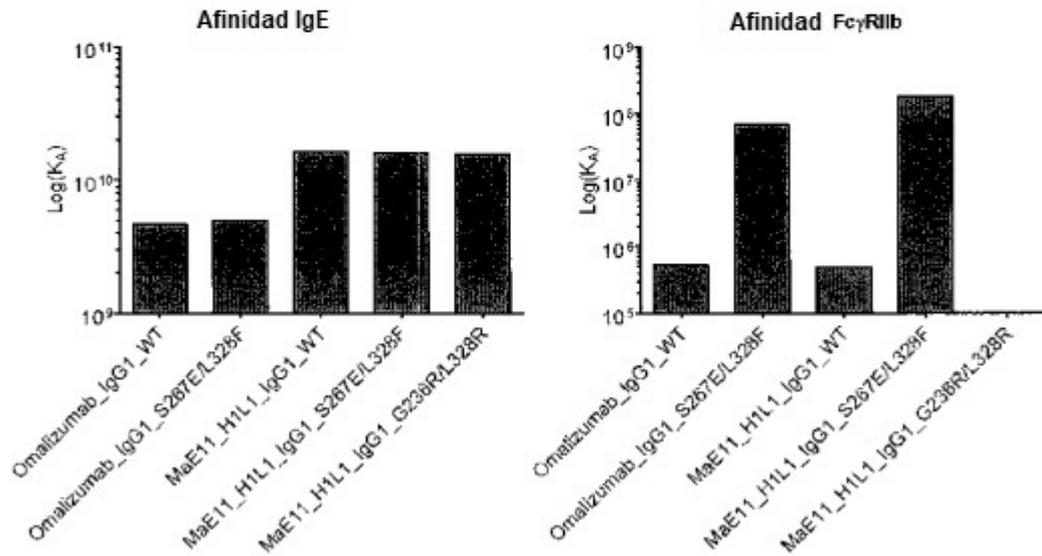


Figura 10

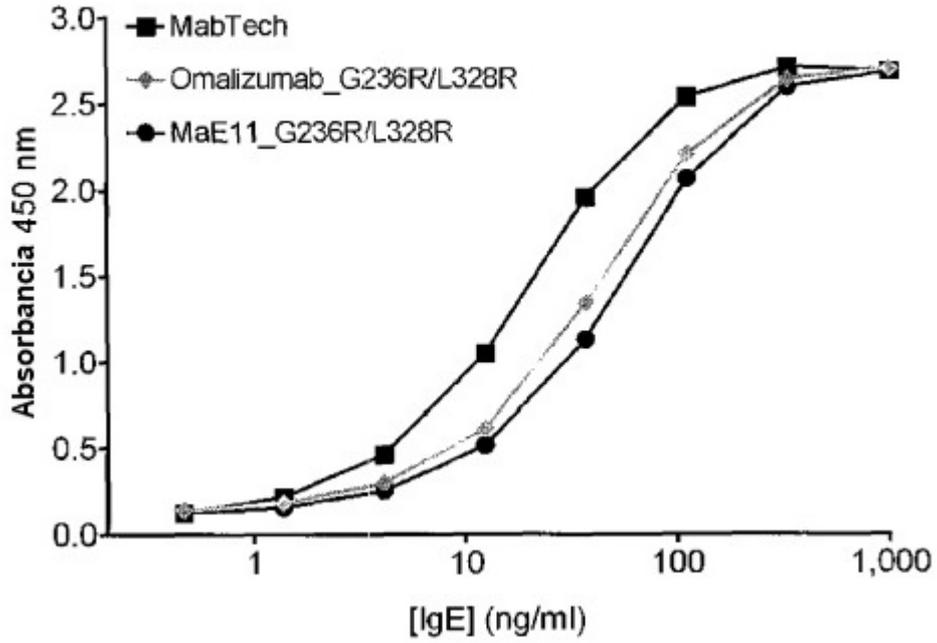


Figura 11

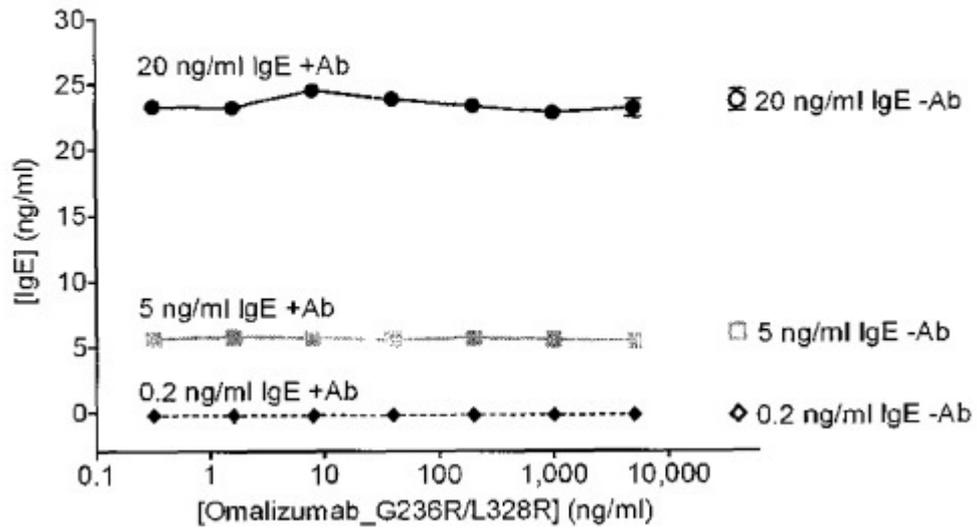


Figura 12

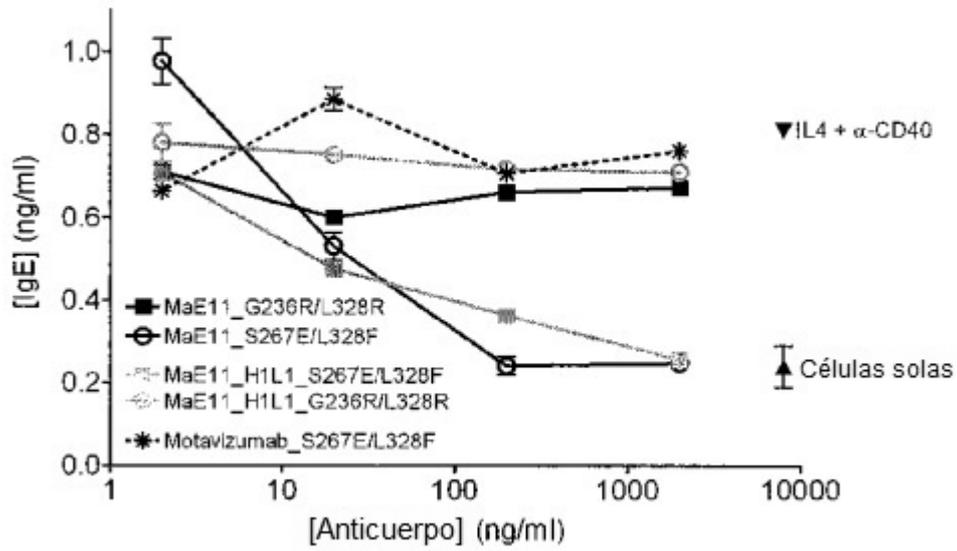


Figura 13

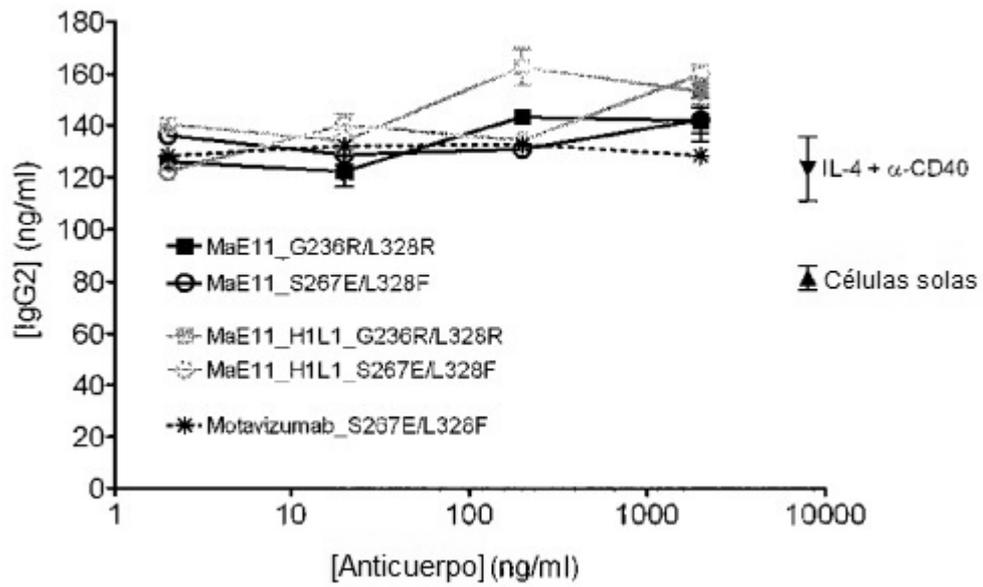


Figura 14

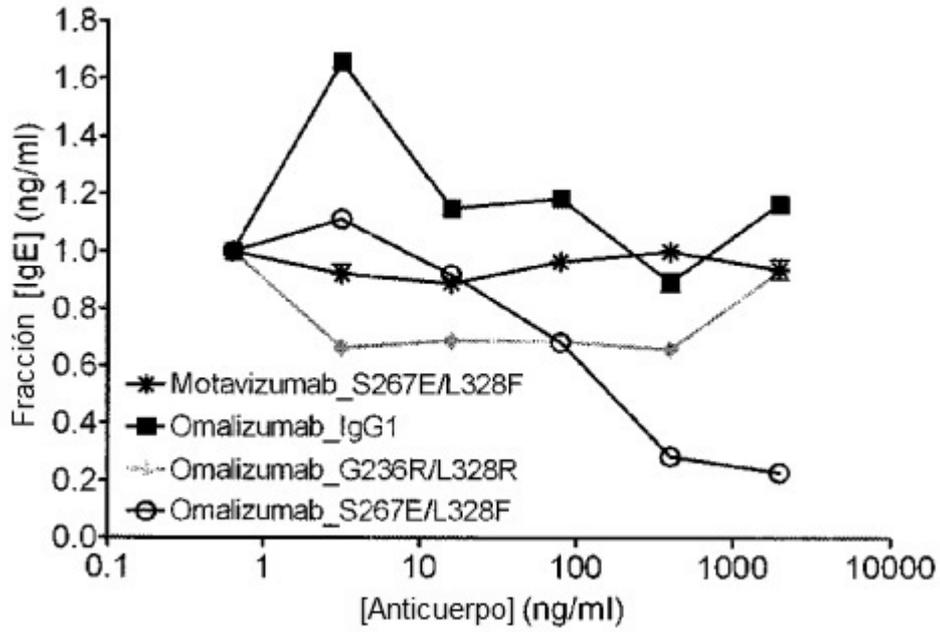


Figura 15

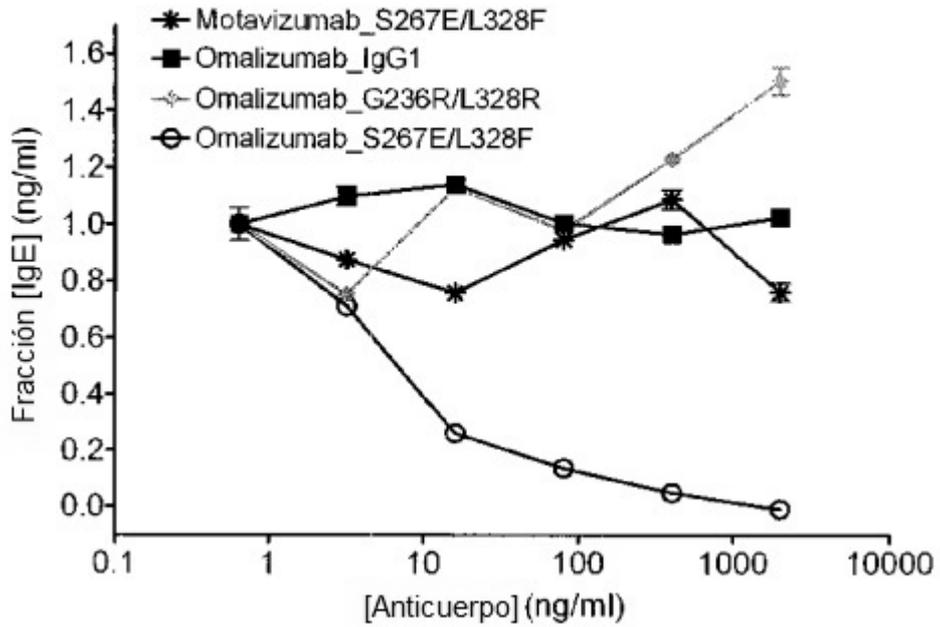


Figura 16

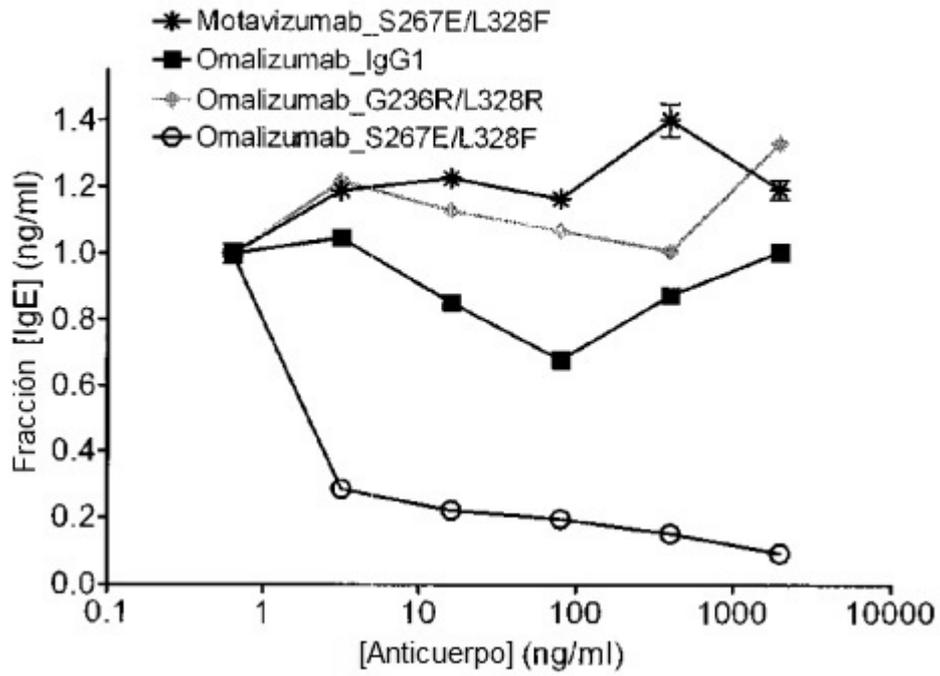


Figura 17

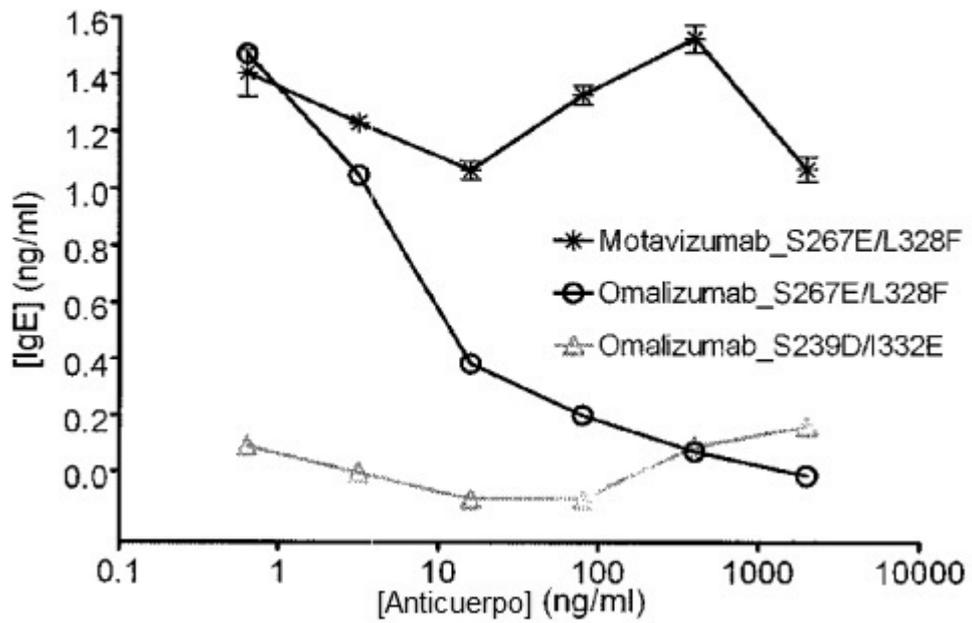


Figura 18

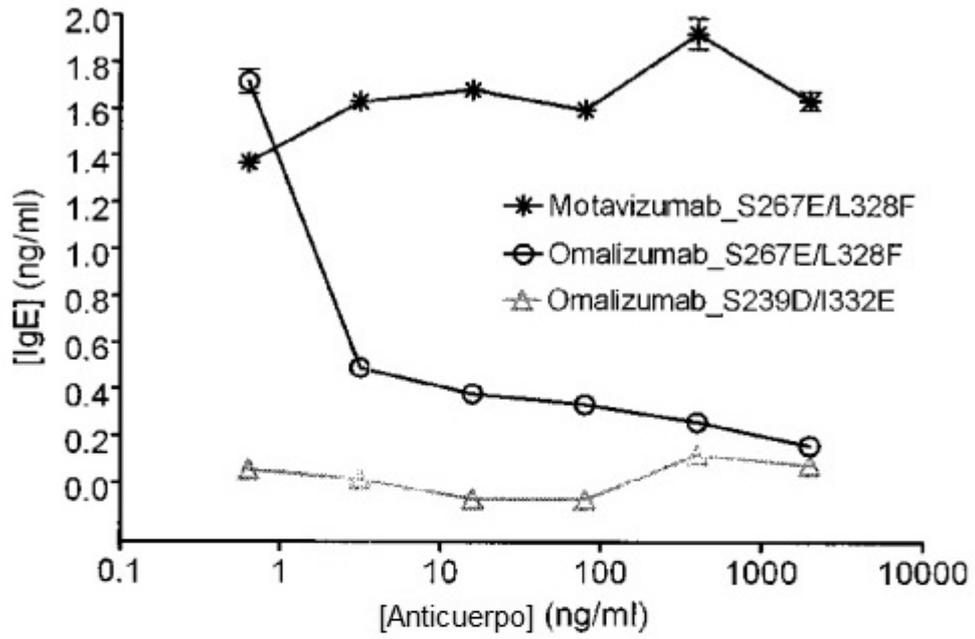


Figura 19

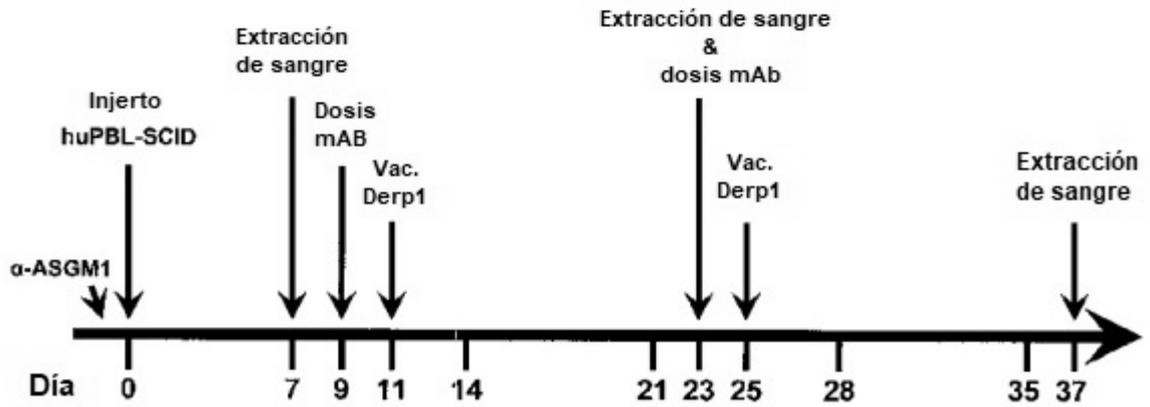


Figura 20

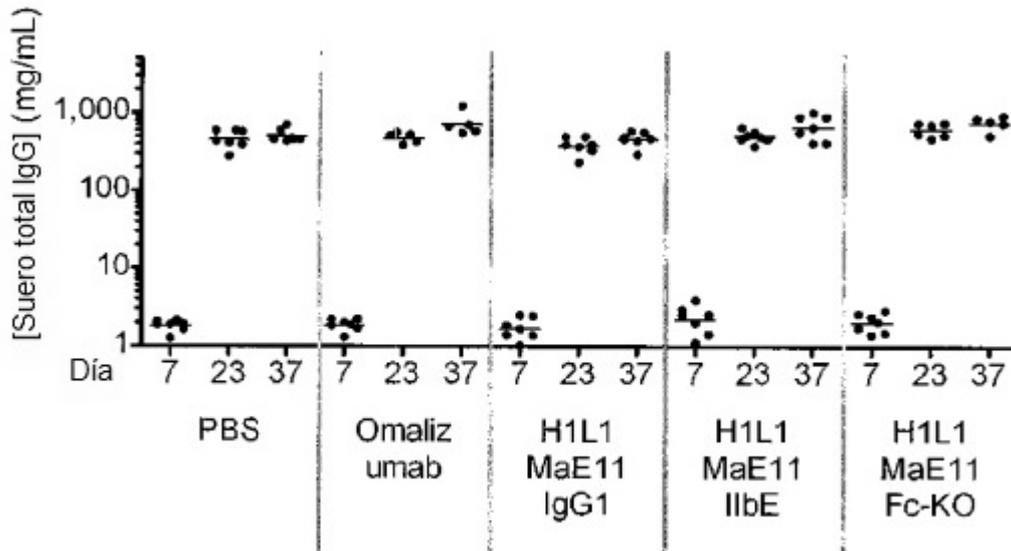


Figura 21

