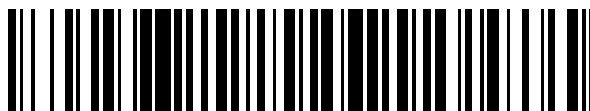


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 720 136**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.12.2011** **PCT/AU2011/001662**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012** **WO12083370**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011** **E 11850362 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019** **EP 2654790**

54 Título: **Anticuerpo modificado con semivida mejorada**

30 Prioridad:

22.12.2010 US 201061425858 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2019

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICALS AUSTRALIA PTY LTD
(100.0%)
Level 2, 37 Epping Road
Macquarie Park, NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**WILSON, DAVID y
TAURA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 720 136 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

Anticuerpo modificado con semivida mejorada

5 Solicitudes relacionadas

El presente documento reivindica prioridad de USSN 61/425.858.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos cuya semivida *in vivo* está aumentada por la combinación de (i) una región de Fc de IgG4 modificada o un dominio de unión FcRn del mismo y (ii) una secuencia de región de bisagra de IgG4 modificada.

15 Antecedentes de la invención

La IgG es la clase de inmunoglobulina más prevalente en el ser humano y en otros mamíferos, y se utiliza en diversos tipos de inmunoterapias y procedimientos de diagnóstico. Un problema crítico en estas terapias es el tiempo de persistencia de inmunoglobulinas en la circulación. La tasa de eliminación de una inmunoglobulina administrada directamente afecta a la cantidad y a la frecuencia de dosificación de la inmunoglobulina. Los estudios de catabolismo de IgG en la circulación han identificado las porciones del dominio constante de las IgG que controlan el metabolismo de las IgG, incluyendo la tasa de degradación de IgG en el suero a través de interacciones con el FcRn (receptor Fc neonatal). La elevada afinidad de unión por el FcRn aumenta la semivida en circulación (o sérica) de una IgG (véase, por ejemplo, Kim et al., Eur J Immunol., 24:2429 (1994)). Los métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas se describe, por ejemplo, en los documentos WO 97/43316, US 5.869.046, US 5.747.035, WO 96/32478. Los métodos para fusionar las moléculas a anticuerpos o fragmentos de dominio de unión a FcRn de las mismas se describen por ejemplo en el documento WO 99/43713. Sin embargo, los documentos anteriores no desvelan mutantes específicos en el dominio constante de la IgG que afecta a la semivida.

La modificación de las moléculas de IgG mediante sustitución, adición o delección de aminoácidos para aumentar o reducir la afinidad por FcRn se desvela en el documento WO 98/23289, sin embargo, este documento no enumera ninguno de los mutantes específicos que presenta semividas *in vivo* más largas o bien más cortas.

Un mutante de la IgG1 de ratón que ha demostrado aumentar la semivida en circulación es la mutación triple Thr252Ala, Thr254Ser y Thr256Phe descrita, por ejemplo, en el documento WO 97/34631. MedImmune (US 7.083.784) ha demostrado que, en el contexto de la IgG1 humana, las modificaciones de uno o más restos de aminoácidos 251-256, 285-290 y 308-314, en el dominio CH2 y de los restos de aminoácidos 385-389 y 428-436 en el dominio de CH3 pueden aumentar la afinidad de los dominios constantes por FcRn y, por lo tanto, asegurar la semivida en circulación. En particular, demostraron que una triple mutación M252Y, S254T y T256E, denominada "YTE" en el Fc de un anticuerpo de isotipo de IgG1 humana puede aumentar la semivida en circulación de los anticuerpos, aproximadamente 2-3 veces en primates no humanos.

45 *Características de los anticuerpos de isotipo IgG4*

IgG4 difiere de otros isotipos de IgG humana en que tras el SDS-PAGE en condiciones no reductoras, se observan dos especies de proteínas, siendo la especie principal una IgG tetramérica (H2L2, es decir, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) y siendo una segunda especie menor una "semiinmunoglobulina" que contiene una sola cadena pesada y una sola cadena ligera (HL). Estos hallazgos indican la heterogeneidad en la formación de puentes disulfuro entre las dos cadenas pesadas en la región de bisagra. Además, cuando se mezclan juntas diferentes IgG4 humanas con diferentes especificidades de unión a antígeno, las moléculas individuales de IgG4 son capaces de disociarse en semiinmunoglobulinas (HL) y que se reasocian para formar la IgG tetramérica (H2L2) que se une a dos antígenos diferentes (anticuerpos biespecíficos). Se cree que la especie HL es el principal intermediario en el ensamblaje de la IgG4. El análisis de las secuencias de bisagra de las cadenas pesadas de la IgG humana sugirió que la presencia de serina en el resto 228 (también citada en algunas publicaciones como el resto 241; para disipar cualquier duda, esto se refiere a la serina en el centro de la secuencia CPSCP de la región de bisagra de la IgG4 (SEQ ID NO:1)) de la IgG4 (de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 4^a Edición. Washington DC United States Department of Health and Human Services) puede ser la causa de la heterogeneidad. Cuando este resto en la IgG4 se modifica de serina a prolina (el resto hallado de forma natural en esa posición en IgG1 e IgG2), esto lleva a la producción de un anticuerpo homogéneo con una semivida sérica prolongada (Angal S et al., Molecular Immunology vol 30, no 1:105-108 (1993); Labrijn et al, Nature Biotechnology vol 27, no 8:767-771; Schuurman J et al., Molecular Immunology 38 (2001) 1-8).

Existe la continua necesidad de generar anticuerpos para fines terapéuticos con propiedades mejoradas, tales como una semivida en circulación mejorada.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado, que se une específicamente a interleucina (IL)-5 que comprende: (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat; y (ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana modificada para comprender la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat; en donde la combinación de modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo de la semivida *in vivo* del anticuerpo de interleucina (IL)-5 modificado en comparación con los correspondientes anticuerpos que tienen (i) o (ii) solo.

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la combinación de las modificaciones anteriores aumenta la semivida en circulación de la molécula en relación con su contrapartida de tipo silvestre sin modificar sustancialmente más larga que cualquiera de las modificaciones de la región Fc o solo la modificación de la región de bisagra. Por otra parte, la combinación de las modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo (sinérgico) de la semivida. Debido a que cualquier modificación en un fármaco basado en proteína humana (incluyendo una proteína que comprende una región constante de anticuerpo humano) aumenta el riesgo de inducir una respuesta inmunitaria anti-fármaco en un paciente, en general, es aconsejable limitar el número de dichas mutaciones para limitar el riesgo presumiblemente aditivo de cada mutación con respecto a inducir tales respuestas inmunitarias frente al fármaco. Sin embargo, debido a los sorprendentes resultados descritos en el presente documento, la combinación de dos clases de sustituciones (modificaciones de Fc y modificaciones de bisagra) da como resultado un efecto supra-aditivo en el aumento de la semivida en circulación de los anticuerpos IgG4. En consecuencia, esta combinación proporciona una ventaja inesperada que puede superar una desventaja teórica en relación con el aumento de la incidencia de promover reacciones inmunológicas anti-fármaco. Las ventajas de aumentar la semivida de una molécula serán inmediatamente evidentes para el experto en la materia. Tales beneficios incluyen una menor dosificación y/o frecuencia de administración que reduce el riesgo de eventos adversos en un sujeto y reduce el coste. Por consiguiente, tales inmunoglobulinas con una semivida aumentada son de importancia farmacéutica significativa.

Además, debido a que las moléculas comprenden los dominios constantes del isotipo de IgG4 y una región de bisagra de IgG4, las moléculas no presentan o presentan una mínima función efectora *in vivo*.

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo aislado, que se une específicamente a interleucina (IL)-5 que comprende: (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat; y (ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana modificada para comprender la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat; en donde la combinación de modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo de la semivida *in vivo* del anticuerpo de interleucina (IL)-5 modificado en comparación con los correspondientes anticuerpos que tienen (i) o (ii) solo.

La semivida *in vivo* aumentada del anticuerpo, se determina en referencia a la semivida de un correspondiente anticuerpo IgG4 humano, que carece de las sustituciones anteriores.

La presente invención también proporciona un anticuerpo aislado que se une de manera específica a la interleucina (IL)-5, que comprende: (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat; y (ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana modificada para comprender la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat; para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno caracterizado por una producción excesiva de eosinófilos, en donde la combinación de modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo de la semivida *in vivo* del anticuerpo de interleucina (IL)-5 modificado en comparación con los correspondientes anticuerpos que tienen (i) o (ii) solo.

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo superhumanised®, un anticuerpo desinmunizado o un anticuerpo de superficie remodelada.

A lo largo de la memoria descriptiva, la numeración de los restos en una cadena pesada de inmunoglobulina es la del índice EU o el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5ª Ed., Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1991, National Institutes of Health, Bethesda. El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración EU del anticuerpo de IgG1 humano (Edelman et al., Proc. Natl. Acad. EE.UU., 63, 78-85, 1969). Las secuencias de aminoácidos de los isotipos IgG2, IgG3 e IgG4 se alinean con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último resto de cisteína de las respectivas regiones bisagra, lo que forma los enlaces S-S entre las cadenas pesadas, en las mismas posiciones.

Los restos de aminoácidos 251-256 de acuerdo con el índice EU como en Kabat se localizan en el dominio CH2 de la cadena pesada de la región Fc de la inmunoglobulina. Estos restos han estado implicados en la unión de la región de Fc al FcRn y, por lo tanto, están implicados en la alteración de la semivida del anticuerpo.

- 5 Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, pero sin limitación, (i) un fragmento Fab (ii) un fragmento Fd, (iii) un fragmento Fv, (iv) un fragmento dAb, (v) las regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), (viii) Fv de cadena simple biespecíficos, y (ix) diacuerpo (x) triacuerpo y (xi) tetracuerpo.

- 10 La secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana de acuerdo con la invención comprende una sustitución S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Esta sustitución también se ha citado como S241P según Kabat et al (1987 Sequences of proteins of immunological interest. United States Department of Health and Human Services, Washington DC). La sustitución tiene el efecto de hacer que la secuencia del centro de la región de bisagra sea la misma que la de un anticuerpo de isotipo IgG1 o IgG2 de tipo silvestre. Con respecto al anticuerpo de isotipo IgG4, da como resultado la producción de la forma homogénea del anticuerpo IgG4 y, por lo tanto, anula la disociación y la reasociación de las cadenas pesadas que a menudo lleva a la producción de anticuerpos IgG4 heterodiméricos.

El anticuerpo de la invención comprende una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo que comprende sustituciones en cada uno de los restos 252, 254 y 256 de la secuencia de la región Fc de IgG4 humana.

- 20 En particular, el resto 252 se sustituye con tirosina (M252Y), el resto 254 se sustituye con treonina (S254T) y el resto 256 se sustituye con ácido glutámico (T256E). Estas sustituciones se citan de manera colectiva como la "modificación YTE".

- 25 En otra realización, el anticuerpo de acuerdo con la invención además se puede fusionar de manera recombinante, conjugar químicamente o diseñar genéticamente para que contenga un resto. El resto de acuerdo con la invención se puede seleccionar de, pero sin limitación, un agente terapéutico que está unido directa o indirectamente al anticuerpo, una citotoxina, un radioisótopo, un agente inmunomodulador, un agente antiangiogénico, un agente de antineovascularización y/u otro agente de vascularización, una toxina, un agente antiproliferativo, un agente proapoptótico, un agente quimioterapéutico y un ácido nucleico terapéutico.

- 30 Por consiguiente, en un ejemplo, la presente invención también proporciona un anticuerpo aislado que se une de manera específica a IL-5 que comprende:

- 35 (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 humana o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numerados de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y
(ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana que comprende la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat,

- 40 en donde la semivida *in vivo* del anticuerpo modificado aumenta en comparación con la semivida del correspondiente anticuerpo sin modificar.

- 45 En un ejemplo particular, el correspondiente anticuerpo anti-IL-5 sin modificar es hu39D10.

- En otra realización, la secuencia Fab del anticuerpo aislado se puede corresponder con la secuencia de la región variable de la cadena ligera y pesada de mepolizumab.

- 50 En otro ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a IL-5, comprendiendo el anticuerpo una secuencia de la región constante de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 6 y una secuencia de la región variable de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO:7. En otro ejemplo, el anticuerpo que se une de manera específica a IL-5, comprende además una cadena ligera que comprende las secuencias de la región variable y constante establecidas en la SEQ ID NO:8.

- 55 En un ejemplo, la invención proporciona el uso de un anticuerpo aislado con una semivida *in vivo* aumentada que se une de manera específica a IL-5, que comprende:

- 60 (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 humana o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numerados de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y
(ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana que comprende la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat,

- 65 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno caracterizado por la producción de eosinófilos en exceso en un sujeto.

En un ejemplo, el trastorno se caracteriza por la producción de eosinófilos en exceso (eosinofilia).

Un trastorno caracterizado por la producción de eosinófilos en exceso se puede seleccionar del grupo que consiste en asma atópica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, rinitis no alérgica, asma, asma grave, neumonía eosinófila crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedad celíaca, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome hipereosinófilo, reacciones edematosas incluyendo angiodema episódico, infecciones helmínticas, dermatitis oncocercal, esofagitis eosinófila, gastritis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, enteritis eosinófila, colitis eosinófila, micropoliposis nasal, poliposis nasal, asma por intolerancia a la aspirina, apnea del sueño obstructiva, asma crónica, enfermedad de Crohn, escleroderma y fibrosis endomiocárdica.

En otro ejemplo, el trastorno es una enfermedad autoinmune.

También se apreciará que el anticuerpo anti-IL-5 modificado de acuerdo con la invención se puede usar en métodos de profilaxis o de diagnóstico relacionados con un trastorno caracterizado por una producción de eosinófilos en exceso.

La presente invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un anticuerpo tal como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier realización.

La presente invención también proporciona una célula transformada que expresa un anticuerpo tal como se describe en el presente documento de acuerdo con cualquier realización.

La presente invención también proporciona una célula transformada que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo tal como se describe en el presente documento.

En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado de acuerdo con la invención, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de la cadena pesada de relizumab, incluyendo el dominio variable y el dominio constante de IgG4, las secuencias del dominio constante (isotipo de IgG4 natural) o el dominio constante de IgG4 con la mutación S228P, las mutaciones "YTE" o una combinación de las mutaciones S228P e YTE; también se muestra la secuencia del dominio variable de la cadena pesada de hu39D10 y la cadena ligera de hu39D10.

La Figura 2 muestra la secuencia del dominio extracelular del FcRn humano.

La Figura 3 muestra la secuencia de la parte madura de la microglobulina beta2 humana.

La Figura 4 muestra un ensayo basado en ELISA para medir la afinidad del FcRn humano por hu39D10 que contiene un dominio Fc de IgG4 natural o uno que lleva la mutación S228P, las mutaciones YTE o tanto la mutación S228P como las mutaciones YTE.

La Figura 5 muestra un estudio PK en ratones con FcRn humanizado, es decir, ratones que tienen el gen FcRn endógeno deletado pero que tienen la expresión ectópica de la contraparte humana. En el día 0, los ratones recibieron hu39D10 o variantes que contienen o bien solo las sustituciones YTE, o solo la sustitución de bisagra (S228P) o ambos tipos de sustituciones. A cada ratón se le extrajo sangre del seno retroorbital a las 2, 12, 24 horas y a los 2, 4, 7, 10, 14, 18, 21 y 28 días. Las muestras de plasma se analizaron para la concentración de anticuerpo humanizado. Los niveles de anticuerpo se expresan como un porcentaje del nivel en el punto temporal de 24 horas en el mismo ratón.

La Figura 6 muestra la secuencia de CD33 del anticuerpo huMab195 en la que el dominio Fc es un isotipo de IgG4 que contiene las modificaciones S228P e YTE; también se muestra la cadena ligera de huMab195.

La Figura 7 muestra la secuencia del dominio extracelular del CD33 humano - proteína de fusión de Fc.

La Figura 8 muestra un estudio PK en ratones con FcRn humanizado, es decir, ratones que tienen el gen FcRn endógeno deletado pero que tienen la expresión ectópica de la contraparte humana. En el día 0, los ratones recibieron huMab195 con un dominio Fc de IgG4 natural o variantes que contienen o bien solo las sustituciones YTE, o solo la sustitución de bisagra (S228P) o ambos tipos de sustituciones. A cada ratón se le extrajo sangre del seno retroorbital a las 2, 12, 24 horas y a los 2, 4, 7, 10 y 14 días. Las muestras de plasma se analizaron para la concentración de anticuerpo humanizado. Los niveles de anticuerpo se expresan como un porcentaje del nivel en el punto temporal de 24 horas en el mismo ratón.

La Figura 9 muestra la secuencia de la parte de bisagra-Fc de la cadena pesada de la IgG4 humana natural y la secuencia de la parte de bisagra-Fc de la cadena pesada de la IgG4 humana con mutaciones S228P e YTE y que carece de la lisina en C-terminal.

Descripción detallada de la invención

Generalidades

- 5 El término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" se debe interpretar bien como "X e Y" o "X o Y", y se debe considerar que proporcionan un soporte explícito para ambos significados o para cualquiera de los significados.

10 En toda esta especificación, salvo que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a una única etapa, composición de materia, grupo de etapas o grupo de composiciones de materia se debe entender que abarca una y una pluralidad (es decir, uno o más) de esas etapas, composiciones de materia, grupos de etapas o grupos de composiciones de materia. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el" o "la" incluyen aspectos plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a "uno" incluye uno solo, así como dos o más; la referencia a "una" incluye una sola, así como dos o más; la referencia a "el" o "la" incluye uno solo, así como dos o más, etcétera.

15 Cada ejemplo de la divulgación se aplicará mutatis mutandis a todas y cada una de las demás realizaciones, a menos que se indique específicamente lo contrario.

20 Los expertos en la materia apreciarán que la divulgación en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones que no sean las descritas específicamente. Debe entender que la divulgación abarca todas estas variaciones y modificaciones. La divulgación también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos a o indicados en la presente memoria descriptiva, de manera individual o colectiva, y cualquiera y todas las características de dos o más etapas o características cualquiera.

25 El alcance de la presente divulgación no debe limitarse a las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que están pensadas solo con el fin de ejemplificación. Los productos, composiciones y métodos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del alcance de la divulgación.

30 Las composiciones de materia y los métodos descritos en el presente documento se producen o se realizan sin experimentación excesiva utilizando, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, virología, tecnología del ADN recombinante, síntesis de péptidos en solución, síntesis de péptidos en fase sólida e inmunología. Tales procedimientos se describen, por ejemplo, en Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York, Segunda Edición (1989), la totalidad de los Vols I, II y III; Benny K.C.Lo, Antibody Engineering: Methods and Protocols, (2004) Humana Press, Vol. 248; DNA Cloning: A Practical Approach, Vols. I y II (D. N. Glover, ed., 1985), IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (M. J. Gait, ed, 1984) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto, y en particular, los artículos en el mismo por Gait, ppl-22; Atkinson *et al*, págs 35-81; Sproat *et al*, págs 83-115; y Wu *et al*, págs 135-151; 4. Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach (B. D. Hames y S. J. Higgins, eds., 1985) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach (1986) IRL Press, Oxford, la totalidad del texto; Perbal, B., A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan, eds., Academic Press, Inc.), la totalidad de la serie; J.F. Ramalho Ortigao, "The Chemistry of Peptide Synthesis" En: Knowledge database of Access to Virtual Laboratory website (Interactiva, Alemania); Sakakibara, D., Teichman, J., Lien, E. Land Fenichel, R.L. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun. 73 336-342; Merrifield, R.B. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2149-2154; Barany, G. y Merrifield, R.B. (1979) en The Peptides (Gross, E. y Meienhofer, J. eds.), vol. 2, págs. 1-284, Academic Press, Nueva York. 12. Wunsch, E., ed. (1974) Synthese von Peptiden in Houben-Weyls Methoden der Organischen Chemie (Müller, E., ed.), vol. 15, 4ª edición, Partes 1 y 2, Thieme, Stuttgart; Bodanszky, M. (1984) Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. y Bodanszky, A. (1984) The Practice of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Heidelberg; Bodanszky, M. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. 25, 449-474; Handbook of Experimental Immunology, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986, Blackwell Scientific Publications); y Animal Cell Culture: Practical Approach, Tercera Edición (John R. W. Masters, ed., 2000), ISBN 0199637970, la totalidad del texto.

55 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende", o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Definiciones

60 Tal como se usa en el presente documento, "correspondiente" anticuerpo sin modificar se refiere a un anticuerpo de la misma secuencia que el anticuerpo modificado pero sin los cambios a la secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento, en particular, el Fc y la región de bisagra.

65 El término "epítipo" pretende referirse a la parte de una molécula antigénica para la que se produce un anticuerpo y a la que se unirá el anticuerpo. El término "epítipo", como se usa en el presente documento, se refiere a una porción (o porciones) de un péptido que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un

vertebrado, más preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente en un ser humano o un animal transgénico que expresa componentes relevantes del sistema inmunitario humano. Los epítomos pueden comprender proteínas, fragmentos de proteínas, péptidos, hidratos de carbono, lípidos y otras moléculas, pero para los fines de la presente invención son más comúnmente oligopéptidos cortos. El término "epítomo" pretende abarcar un "epítomo inmunogénico", un "epítomo antigénico" o un "epítomo antigénico".

El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula que es capaz de unirse a una diana a través de al menos un sitio de reconocimiento del epítomo, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Los términos inmunoglobulina y anticuerpo se pueden usar de manera intercambiable a lo largo de la memoria descriptiva. La molécula de inmunoglobulina o de anticuerpo incluye anticuerpos de cuatro cadenas (por ejemplo, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas), anticuerpos recombinantes o modificados (por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de CDR injertada, anticuerpos primatizados, anticuerpos desinmunizados, anticuerpos superhumanized®, semianticuerpos, anticuerpos biespecíficos). Un anticuerpo generalmente comprende dominios constantes, que pueden estar dispuestos en una región constante o en un fragmento constante o fragmento cristalizante (Fc). Las formas ejemplares de anticuerpos comprenden una estructura de cuatro cadenas como su unidad básica. Los anticuerpos de longitud completa comprenden dos cadenas pesadas (de aproximadamente 50-70 kD) unidas covalentemente y dos cadenas ligeras (de aproximadamente 23 kD cada una). Cada cadena pesada y ligera comprende regiones variables y dominios constantes. Una cadena ligera generalmente comprende una región variable (si está presente) y un dominio constante y en mamíferos es o bien una cadena ligera κ o una cadena ligera λ . Una cadena pesada generalmente comprende una región variable y uno o dos dominios constantes enlazados mediante una región de bisagra a un(os) dominio(s) constante(s) adicional(es). Las cadenas pesadas de mamíferos son de uno de los siguientes tipos α , δ , ϵ , γ o μ . Cada cadena ligera está unida covalentemente a una de las cadenas pesadas. Por ejemplo, las dos cadenas pesadas y las cadenas pesada y ligera se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro intercatenarios y mediante interacciones no covalentes. El número de enlaces disulfuro intercatenarios puede variar entre los diferentes tipos de anticuerpos. Cada cadena tiene una región variable en N-terminal (V_H o V_L , en donde cada una son de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) y uno o más dominios constantes en el extremo C-terminal. El dominio constante de la cadena ligera (C_L , que es de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud) se alinea con y se une mediante enlace disulfuro al primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1 que es de aproximadamente 330-440 aminoácidos de longitud). La región variable de la cadena ligera se alinea con la región variable de la cadena pesada. La cadena pesada del anticuerpo puede comprender 2 o más dominios C_H (tales como, C_H2 , C_H3 y similares) y puede comprender una región de bisagra que se puede identificar entre los dominios constantes C_H1 y C_H2 . Los anticuerpos no modificados pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂) o subclase.

La expresión "región constante" o "fragmento constante" se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina o de anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos central conservada en relación con la otra porción de la inmunoglobulina o anticuerpo, llamada la región variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. En la cadena pesada, la región constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3.

La expresión "región Fc" tal como se usa en el presente documento se refiere a la porción de una molécula de anticuerpo o inmunoglobulina que se correlaciona con un fragmento cristalizante obtenido mediante la digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc consiste en la región de C-terminal de una cadena pesada de IgG compuesta de aproximadamente la mitad de C-terminal de las dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están unidas mediante enlaces disulfuro. Aunque los límites pueden variar ligeramente (en algunos casos, incluye parte de la bisagra), tal como se numera de acuerdo con el índice de EU de Kabat, la región Fc se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 447. La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde el aminoácido 231 al aminoácido 341 de acuerdo con el índice EU de Kabat. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde el aminoácido 342 al 447 de acuerdo con el índice EU de Kabat. La región Fc no tiene actividad de unión a antígeno, pero contiene el resto de hidrato de carbono y el sitio de unión para el receptor de Fc, incluyendo el receptor Fc neonatal (FcRn).

La expresión "dominio de unión al FcRn de la misma" tal como se usa en el presente documento se refiere a una porción de la región Fc que es capaz de unirse al FcRn. En el presente contexto, también pretende referirse a un fragmento de la secuencia de la región Fc que incluye al menos el dominio CH2.

La expresión "receptor FcRn" tal como se usa en el presente documento se refiere a un receptor de Fc ("n" indica neonatal) que está implicado en la transferencia de las IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primate y a un neonato desde el calostro a través del intestino delgado. El FcRn también está implicado en el mantenimiento de los niveles constantes de IgG sérico mediante la unión de las moléculas de IgG y el reciclado de las mismas en el suero. La unión de FcRn a las moléculas de IgG es estrictamente dependiente del pH, con una unión óptima a pH 6,0. El FcRn normalmente forma complejos con la microglobulina beta2.

La "región de bisagra" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una parte de la cadena pesada de inmunoglobulina rica en prolina entre las regiones Fc y Fab que confiere movilidad en los dos brazos Fab de la molécula

de anticuerpo. Se localiza entre el primer y el segundo dominio constante de la cadena pesada. La región de bisagra incluye restos de cisteína que están implicados en los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas. Generalmente se define como que abarca desde Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat (o Glu226 a Pro243 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando los restos de cisteína primero y último que forman enlaces disulfuro (S-S) entre cadenas pesadas en las mismas posiciones (véase por ejemplo el documento WO 2010/080538). La región de bisagra incluye restos de cisteína que están implicados en los enlaces disulfuro entre cadenas pesadas.

El término "secuencia de región de bisagra central" tal como se usa en el presente documento pretende referirse a la secuencia de aminoácidos CPSCP (SEQ ID NO:1) presente en la IgG4 y que se extiende desde el aminoácido 226 hasta el 230 de acuerdo con el índice EU de Kabat (a menudo citada como la bisagra inferior). La región de bisagra central se distingue de la región de bisagra superior que en una IgG4 humana es la secuencia ESKYGPP.

La expresión "región variable" tal como se usa en el presente documento se refiere a las partes de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo, tal como se define en el presente documento, que es capaz de unirse específicamente a un antígeno, e incluye las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR); es decir, CDR1, CDR2 y CDR3, y regiones marco (FR, del inglés *Framework region*). Por ejemplo, la región variable comprende tres o cuatro FR (por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y opcionalmente FR4) junto con tres CDR. En el caso de una proteína que proviene de una IgNAR, la proteína puede carecer de una CDR2. V_H se refiere a la región variable de la cadena pesada. V_L se refiere a la región variable de la cadena ligera.

El término "Fab" tal como se usa en el presente documento pretende referirse a una región de un anticuerpo compuesta de un dominio constante y un dominio variable de cada una de las cadenas pesadas y ligeras (fragmento de unión a antígeno monovalente), pero en donde la cadena pesada está truncada de tal forma que carece del dominio CH2 y CH3 (es decir, V_H, CH1, V_L y CL), y también puede carecer de algo o de toda la región de bisagra. Se puede producir mediante la digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína. Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa.

El término Fab' tal como se usa en el presente documento se puede obtener tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido por reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada que comprende una V_H y un único dominio constante. Se obtienen dos fragmentos Fab' por anticuerpo tratado de este modo.

Por "scFv" se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. N.º 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030 y 5.856.456. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv véase Pluckthun (1994) *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* vol 113 ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, Nueva York) págs. 269-315. El complejo del dominio V_H y V_L de los fragmentos de Fv también se pueden estabilizar mediante un enlace disulfuro (Pat. de EE.UU. N.º 5.747.654).

Por "sin o poca función efectora" se refiere a que determinadas actividades normalmente atribuibles a los anticuerpos de tipo IgG1 tales como la fijación de complemento o la estimulación de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) se reducen o eliminan.

El término "aislado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo eliminado de su entorno natural. Por lo tanto, un anticuerpo producido por un hospedador recombinante se considera aislado para los fines de la presente invención. Preferentemente, el anticuerpo aislado está sustancialmente purificado.

Por "sustancialmente purificado" se refiere a que el anticuerpo es sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la célula o del tejido original del que proviene, o es sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. El lenguaje incluye preparaciones de un anticuerpo que está separado de los componentes celulares de las células de las que se aísla o producido de manera recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que es sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones que tienen menos de aproximadamente el 30 %, el 20 %, el 10 % o el 5 % (por peso seco) de proteína contaminante y medio de cultivo.

La expresión "semivida *in vivo*" tal como se usa en el presente documento se refiere a una semivida en circulación de un anticuerpo particular, que contiene una región Fc y/o un dominio de unión a FcRn del mismo en la circulación de un animal dado y se representa mediante un tiempo requerido para que se elimine de la circulación la mitad de la cantidad administrada en el animal. Cuando una curva de eliminación de un anticuerpo dado de acuerdo con la invención se construye en función del tiempo, la curva normalmente es bifásica con una fase alfa rápida que representa un equilibrio de las moléculas de IgG inyectadas entre el espacio intra y extravascular y que en parte se determina por el tamaño de las moléculas y una fase beta más larga que representa el catabolismo de las moléculas de IgG en el

espacio intravascular. La expresión "semivida *in vivo*" prácticamente se corresponde con la semivida de las inmunoglobulinas IgG4 modificadas o sin modificar o las proteínas de fusión en la fase beta.

La expresión "semivida *in vivo* aumentada" tal como se usa en el presente documento se refiere a que el anticuerpo modificado de acuerdo con la invención tiene una mayor persistencia en el suero o en el plasma y/o lleva más tiempo reducir la mitad de la concentración máxima medida en el suero o en el plasma en relación con el mismo anticuerpo que no contiene las mismas sustituciones.

El término "recombinante" debería comprenderse que se refiere al producto de recombinación genética artificial. Por consiguiente, en el ámbito de una proteína recombinante que comprende un dominio de unión a antígeno, este término no abarca un anticuerpo de origen natural en el cuerpo de un sujeto que es el producto de la recombinación natural que tiene lugar durante la maduración de los linfocitos B. Sin embargo, si se aísla dicho anticuerpo, se considera una proteína aislada que comprende una región variable de anticuerpo. De manera similar, si un ácido nucleico que codifica la proteína se aísla y se expresa usando medios recombinantes, la proteína resultante es una proteína recombinante que comprende un dominio de unión a antígeno del anticuerpo. La expresión recombinante también abarca un anticuerpo, inmunoglobulina o proteína de fusión expresada por medios recombinantes cuando está dentro de una célula, tejido o sujeto, por ejemplo, en el que se expresa.

La expresión "se une específicamente" se refiere a una molécula (por ejemplo, anticuerpo) que se une a un antígeno de manera específica o preferente (por ejemplo, epítipo o complejo inmunitario) y no se une específicamente a (es decir, no tiene reacción cruzada con) antígenos, tal como, por ejemplo, otras proteínas relacionadas de manera estructural o funcional, o proteínas con homología de secuencia. Una molécula que se une específicamente a un antígeno puede unirse a otros péptidos o polipéptidos con menor afinidad según lo determinado, por ejemplo, inmunoensayos, BIAcore u otros ensayos conocidos en la técnica. Preferentemente, las moléculas que se unen específicamente a un antígeno no tienen reacción cruzada con otras proteínas. Las moléculas que se unen específicamente a un antígeno pueden identificarse, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. A modo de ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un antígeno preferentemente si se une a dicho antígeno con una constante de disociación (K_D) que es menos que la K_D del anticuerpo para otro antígeno. En otro ejemplo no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos de un orden de magnitud que la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno. En otra realización no limitante, se puede considerar que un anticuerpo se une a un primer antígeno preferentemente si se une a dicho primer antígeno con una afinidad que es al menos de dos órdenes de magnitud que la K_D del anticuerpo para el segundo antígeno.

El término "tratamiento" o "tratar" tal como se usa en el presente documento se refiere a administrar una "cantidad terapéuticamente eficaz" del anticuerpo de acuerdo con la invención suficiente como para reducir o eliminar al menos un síntoma de una enfermedad o afección específica.

El término "prevenir" o "prevención" tal como se usa en el presente documento se refiere a la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo suficiente como para detener u obstaculizar el desarrollo de un trastorno o afección específica.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se debe entender que se refiere a una cantidad suficiente de un anticuerpo para reducir o inhibir uno o más síntomas de una enfermedad clínica a un nivel que está por debajo del observado y aceptado como clínicamente diagnóstico o clínicamente característico de esa enfermedad. El experto en la materia sabrá que dicha cantidad variará en función de, por ejemplo, el(los) anticuerpo(s) específico(s), administrado(s) y/o el sujeto en particular y/o el tipo de gravedad o nivel de enfermedad. Por consiguiente, este término no se debe interpretar como que limita la invención a una cantidad específica, por ejemplo, el peso o la cantidad en lugar de la presente invención abarca cualquier cantidad de los anticuerpos, suficiente como para lograr el resultado indicado en un sujeto.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o que figura en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en los seres humanos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se debería interpretar como un ser humano o primate no humano o mamífero no primate con un FcRn humano.

Sustituciones de aminoácidos

Los métodos de sustitución de aminoácidos se conocen en la materia. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer por mutagénesis de sitio dirigido (por ejemplo, Zoller y Smith Nucl. Acids Res. 10:6487 (1982)). La mutagénesis se puede realizar sintetizando un oligonucleótido que tiene una o más modificaciones en la secuencia del dominio constante de un anticuerpo que se va a modificar. La mutagénesis específica de sitio permite la producción de mutantes a través del uso de secuencias de oligonucleótidos específicas que codifican la secuencia de ADN de la mutación deseada, así como un número suficiente de oligonucleótidos adyacentes para proporcionar una secuencia

de cebador de suficiente tamaño y complejidad de secuencia como para formar un dúplex estable en ambos lados de la unión de eliminación que se está girando. Normalmente, se prefiere un cebador de aproximadamente 17 a aproximadamente 75 nucleótidos o más de longitud, con aproximadamente 10 a aproximadamente 25 restos o más en ambos lados de la unión de la secuencia que se está alterando. Se puede usar una serie de dichos cebadores que introducen una variedad de mutaciones diferentes en una o más posiciones para generar una biblioteca de mutantes.

La técnica de mutagénesis específica de sitio es bien conocida en la materia, (véase, por ejemplo, Kunkel et al., *Methods Enzymol.*, 154:367-82, 1987). En general, la mutagénesis de sitio dirigido se realiza obteniendo en primer lugar un vector de cadena simple o separado de la fusión de dos cadenas de un vector de cadena doble que incluye en su secuencia una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado. Se prepara un cebador de oligonucleótidos que lleva la secuencia mutada deseada, generalmente de manera sintética. Este cebador se hibrida después con el vector de cadena simple, y se somete a encimas de polimerización de ADN tales como la polimerasa T7, con el fin de completar la síntesis de la hebra que lleva la mutación. Por lo tanto, se forma un heterodúplex en donde una hebra codifica la secuencia original no mutada y la segunda hebra lleva la mutación deseada. Este vector de heterodúplex se usa después para transformar o transfectar las células apropiadas, tales como células *E. coli*, y se seleccionan los clones que incluyen los vectores recombinantes que llevan la disposición de secuencia mutada. Como se apreciará, la técnica típicamente emplea un vector de fago que existe tanto en una forma monocatenaria como en una doble cadena. Los vectores típicos útiles en la mutagénesis dirigida al sitio incluyen vectores tales como el fago M13. Estos fagos están fácilmente disponibles comercialmente y su uso es generalmente bien conocido por los expertos en la materia. Los plásmidos de cadena doble también se emplean habitualmente en la mutagénesis de sitio dirigido que elimina la etapa de transferir el gen de interés desde un plásmido hasta un fago. La mutagénesis de sitio dirigido también se ha usado para identificar restos de aminoácidos que influyen en la eliminación en plasma de fragmentos de bisagra-Fc de IgG1 de murino tal como describe en Kim Jin-Kyoo et al., (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 542-548).

Como alternativa, el uso de PCR con enzimas termoestables comercialmente disponibles tales como la ADN polimerasa Taq se puede usar para incorporar un cebador de oligonucleótidos mutagénicos en un fragmento de ADN amplificado que se puede clonar después en un vector de clonación o de expresión apropiado. Véase, por ejemplo, Tomic et al., *Nucleic Acids Res.*, 18(6): 1656, 1987 y Upender et al., *Biotechniques*, 18(1):29-30, 32, 1995, para procedimientos de mutagénesis mediada por PCR. La PCR que emplea una ligasa termoestable además de una polimerasa termoestable también se puede usar para incorporar un oligonucleótido mutagénico fosforilado en un fragmento de ADN amplificado que después se puede clonar en un vector de clonación o de expresión apropiado (véase, por ejemplo, Michael, *Biotechniques*, 16(3):410-2, 1994).

También se pueden usar otros métodos conocidos para los expertos en la materia de producir variantes de secuencia de la región Fc de un anticuerpo o un dominio de unión a FcRn del mismo. Por ejemplo, los vectores recombinantes que codifican la secuencia de aminoácidos del dominio constante de un anticuerpo o un fragmento del mismo se pueden tratar con agentes mutagénicos, tales como hidroxilamina, para obtener las variantes de la secuencia.

Los mutantes que dan como resultado una elevada afinidad por FcRn y una elevada semivida *in vivo* se pueden cribar usando ensayos habituales tales como los descritos a continuación.

Las sustituciones ejemplares de aminoácidos incluyen T250Q y/o M428L o T252A, T254S y T266F o M252Y, S254T y T256E o H433K y N434F de acuerdo con el sistema de numeración EU Kabat. Las sustituciones de aminoácidos adicionales o alternativas se describen, por ejemplo, en los documentos US20070135620 o US7083784.

Anticuerpos de la invención

El anticuerpo de acuerdo con la invención incluye cualquier anticuerpo que se une (tal como se determina mediante los inmunoensayos conocidos en la materia para ensayar la unión específica de antígeno-anticuerpo) a un antígeno y contiene una región Fc o dominio de unión a FcRn. Los anticuerpos pueden ser policlonales, monoclonales o monoespecíficos, biespecíficos (en el contexto de formas multiméricas del anticuerpo), humanos, humanizados, quiméricos, superhumanised®, primatizados o desinmunizados. En otro ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, (o biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad si está presente en forma multimérica).

En particular, el anticuerpo es un tetrámero monoespecífico.

El anticuerpo puede ser de cualquier origen animal. Preferentemente, el anticuerpo es humano o humanizado. Tal como se usa en el presente documento, el término anticuerpo "humano" incluye anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas y que expresan inmunoglobulinas endógenas, tal como se describe por ejemplo en el documento US 5.939.598.

El(los) anticuerpo(s) de la invención comprende(n) una región de bisagra de IgG4 estabilizada. La expresión "región de bisagra de IgG4 estabilizada" se entenderá que se refiere a una región de bisagra de IgG4 que se ha modificado para reducir el intercambio de brazo Fab o la propensión a sufrir intercambio de brazo Fab o la formación de un

semianticuerpo o una tendencia a formar un semianticuerpo. "Intercambio de brazo Fab" se refiere a un tipo de modificación proteica para la IgG4 humana, en la que una cadena pesada de IgG4 y una cadena ligera unida (media molécula) se intercambian por un par de cadenas pesada-ligera de otra molécula de IgG4. Por lo tanto, las moléculas de IgG4 pueden adquirir dos brazos Fab diferentes que reconocen dos antígenos diferentes (dando como resultado moléculas biespecíficas). El intercambio del brazo Fab tiene lugar de forma natural *in vivo* y se puede inducir *in vitro* mediante células sanguíneas purificadas o agentes reductores tales como glutatión reducido. Un "semianticuerpo" se forma cuando un anticuerpo IgG4 se disocia para formar dos moléculas, conteniendo cada una de ellas una única cadena pesada y una única cadena ligera.

La región de bisagra de IgG4 estabilizada comprende una sustitución de serina a prolina en la posición 228 de acuerdo con el sistema de numeración EU de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 y Edelman et al., Proc. Natl. Acad. EE.UU., 63, 78-85, 1969), que se corresponde con una sustitución de serina a prolina en la posición 241 de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 y/o 1991). Para disipar cualquier duda, esto se refiere a la serina en el centro de la secuencia CPSCP de la región de bisagra de la IgG4 (SEQ ID NO:1). Tras la sustitución de serina por prolina, la región de bisagra de IgG4 comprende una secuencia CPPCP. En este sentido, el experto en la materia sabrá que la "región de bisagra" es una parte de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo rica en prolina que se enlaza a las regiones Fc y Fab que confiere movilidad sobre los dos brazos Fab de un anticuerpo.

En un ejemplo, el anticuerpo de la invención puede estar en forma multimérica. Por ejemplo, el anticuerpo puede tomar la forma de un anticuerpo dímero, trímero o multímero de mayor orden de moléculas de inmunoglobulina monoméricas. Los dímeros de las moléculas de inmunoglobulina completas o de fragmentos $F(ab')_2$ son tetravalentes, mientras que los dímeros de los fragmentos Fab o las moléculas scFv son bivalentes. Los monómeros individuales en un multímero de anticuerpo pueden ser idénticos o diferentes, es decir, pueden ser multímeros de anticuerpos heteroméricos u homoméricos. Por ejemplo, los anticuerpos individuales en un multímero pueden tener la misma o especificidades de unión diferentes.

La multimerización de anticuerpos se puede realizar a través de la agregación natural de los anticuerpos o a través de técnicas de enlace químico o recombinante conocidas para el experto en la materia. Por ejemplo, algún porcentaje de preparaciones de anticuerpo purificado forman de manera espontánea agregados proteicos que contienen homodímeros de anticuerpo y otros multímeros de anticuerpo de mayor orden. Como alternativa, los homodímeros de anticuerpo se pueden formar a través de técnicas de enlace químico conocidas en la materia. Como un ejemplo no limitante, los agentes de reticulación bifuncionales incluyendo, aunque no de forma limitativa, SMCC [succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexano-l-carboxilato] y SATA [N-succinimidil S-acetiltio-acetato] (disponibles, por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, 111.)) se pueden usar para formar multímeros de anticuerpo. Un protocolo ejemplar para la formación de homodímeros de anticuerpo se da en Ghetie MA *et al.* Los homodímeros de anticuerpos se pueden convertir a homodímeros $F(ab')_2$ a través de la digestión con pepsina. Otro modo de formar homodímeros de anticuerpo es a través del uso del péptido autofílico TI 5 descrito en Zhao Y y Kohler H J. Immunother (1997) 25(5):396-404.

Como alternativa, los anticuerpos se pueden preparar para que multimericen de forma natural o mediante técnicas del ADN recombinante. Los dímeros de scFv también se pueden formar mediante técnicas recombinantes conocidas en la materia; un ejemplo de la construcción de dímeros de scFv se da en Goel A et al. Cancer Research 60(24):6964-6971. Los multímeros de anticuerpo se pueden purificar mediante cualquier método adecuado conocido en la materia, por ejemplo, la cromatografía por exclusión de tamaño.

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos pueden comprender o, como alternativa, pueden consistir en variantes (incluyendo derivados) de las moléculas de anticuerpo (por ejemplo, los dominios V_H y/o los dominios V_L) descritos en el presente documento, cuyos anticuerpos se unen de manera específica a péptidos antigénicos (por ejemplo, el antígeno IL-5 o el antígeno CD33). Las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia pueden usarse para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR que dan como resultado sustituciones de aminoácidos.

Los derivados de aminoácidos también abarcan sustituciones conservativas de aminoácidos en la región V_L y/o V_H de la inmunoglobulina. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral con una carga similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de la secuencia codificante,

tales como mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden cribar por la actividad biológica para identificar mutantes que conservan la actividad (por ejemplo, la capacidad para unirse a péptidos antigénicos de la invención).

- 5 La expresión "sustitución conservativa" debe entenderse como las sustituciones de aminoácidos establecidas en la Tabla 1.

Tabla 1 Sustituciones ejemplares

Resto original	Sustituciones ejemplares
Ala (A)	val; leu; ile; gly
Arg (R)	lys
Asn (N)	gln; his
Asp (D)	glu
Cys (C)	ser
Gln (Q)	asn; his
Glu (E)	asp
Gly (G)	pro; ala
His (H)	asn; gln
Ile (I)	leu; val; ala
Leu (L)	ile; val; met; ala; phe
Lys (K)	arg
Met (M)	leu; phe
Phe (F)	leu; val; ala
Pro (P)	gly
Ser (S)	thr
Thr (T)	ser
Trp (W)	tyr
Tyr (Y)	trp; phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala

- 10 Por ejemplo, es posible introducir mutaciones solo en las regiones marco o solo en las regiones CDR de una molécula de anticuerpo. Las mutaciones introducidas pueden ser mutaciones de aminoácidos silenciosas o neutras, es decir, que no tienen o tienen poco efecto sobre la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Estos tipos de mutaciones pueden ser útiles para optimizar el uso de codones o mejorar la producción de anticuerpos a partir de una línea celular.

- 15 Como alternativa, las mutaciones de aminoácidos no neutras pueden alterar la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Un experto en la materia sería capaz de diseñar y probar moléculas mutantes con propiedades deseadas tales como la no alteración en la actividad de unión a antígeno o la alteración en la actividad de unión (por ejemplo, mejoras en la actividad de unión a antígeno o cambio en la especificidad de los anticuerpos). Tras la mutagénesis, la proteína codificada se puede expresar de manera habitual y la actividad funcional y/o biológica de la proteína codificada, (por ejemplo, la capacidad para unirse de manera específica a péptidos antigénicos de la invención) se puede determinar usando técnicas descritas en el presente documento o mediante la modificación de técnicas habituales conocidas en la materia.

- 25 Los anticuerpos pueden incluir derivados que se modifican de otro modo mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de manera que la unión covalente no evita que el anticuerpo se una al antígeno. Por ejemplo, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se pueden llevar a cabo mediante técnicas conocidas en la materia, incluyendo la escisión química específica, acetilación,

formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no convencionales.

Los anticuerpos de la invención se pueden sintetizar químicamente. Por ejemplo, un péptido que se corresponde con una porción de una proteína se puede sintetizar mediante el uso de un sintetizador del péptido. Además, si se desea, los aminoácidos no clásicos o los análogos de aminoácidos químicos se pueden introducir como sustituciones y/o adiciones en la secuencia de uno, ninguno, ambos, varios o todos los polipéptidos del complejo.

Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitación, los isómeros D de los aminoácidos comunes, fluoro-aminoácidos, aminoácidos diseñadores tales como beta-metil aminoácidos, C gamma-metil aminoácidos, N gamma-metil aminoácidos y análogos de aminoácidos en general.

La presente invención también proporciona inmunoconjugados que comprenden una reducción del anticuerpo o inmunoglobulina de la presente invención conjugado con un resto distinto, por ejemplo, un agente terapéutico que está unido directa o indirectamente al anticuerpo. Los ejemplos de otros restos incluyen, pero sin limitación, una citotoxina, un radioisótopo (por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111), un agente inmunomodulador, un agente antiangiogénico, un agente de antineovascularización y/u otro agente de vascularización, una toxina, un agente antiproliferativo, un agente proapoptótico, un agente quimioterapéutico y un ácido nucleico terapéutico.

Una citotoxina incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, las destruye). Para una descripción de estas clases de fármacos que se conocen en la materia y sus mecanismos de acción, véase Goodman et al., "The Pharmacological Basis of Therapeutics", de Goodman y Gilman, 8ª edición, Macmillan Publishing Co., 1990. Las técnicas adicionales relevantes para la preparación de inmunotoxinas de anticuerpos se proporcionan en, por ejemplo, Vitetta (1993) y en el documento US 5.194.594. Las toxinas ejemplares incluyen la cadena A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, sarcina alfa, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, el inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232.

Los agentes terapéuticos adecuados para la formación de inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina, antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, dacarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino y otros derivados del platino, tales como carboplatino), antibióticos (tales como dactinomicina (formalmente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (formalmente daunomicina), doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)).

Hay una variedad de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ^{212}Bi , ^{131}I , ^{90}Y y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y agentes terapéuticos se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como, aunque no de forma limitativa, ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil ácido (AcPac), ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida), N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos bis-activos de flúor (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno) y derivados de los mismos. Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta et al. (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietileno triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación del radionucleótido con el anticuerpo (WO 94/11026).

Preparación de anticuerpos

Los anticuerpos pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma que incluyen aquellas conocidas en la materia y enseñadas, por ejemplo, por Harlow et al., Antibodies: A laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press 2ª Edición, 1988).

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, no se limita a los anticuerpos producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión se refiere a cualquier anticuerpo que proviene de un solo clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce.

Los métodos para producir y examinar anticuerpos específicos usando la tecnología de hibridoma son habituales en la técnica. Por ejemplo, es posible inmunizar ratones con un antígeno de interés o una célula que exprese dicho antígeno. Una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Después, se fusionan los esplenocitos a las células de mieloma. Se seleccionan y se clonan los hibridomas por dilución limitante. Los clones se someten luego a ensayo mediante métodos conocidos en la técnica para determinar células que secreten anticuerpos capaces de unirse al antígeno. El fluido de los ascitos, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar inoculando a los ratones por vía intraperitoneal con clones de hibridoma positivos.

Se pueden generar fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos mediante técnicas habituales. Por ejemplo, se pueden producir fragmento Fab y F(ab')₂ mediante escisión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa, y la región variable, la región de CH1 y la región de bisagra de la cadena pesada.

También es posible generar anticuerpos usando diversos métodos de presentación en fagos. En los métodos de presentación en fagos, los dominios funcionales del anticuerpo son presentados en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago puede usarse para presentar dominios de unión al antígeno, tal como el fragmento Fab y Fv o Fv estabilizado con enlaces disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. El fago usado en estos métodos normalmente son fagos filamentosos, incluyendo fd y M13. Los dominios de unión al antígeno son expresados como proteína fusionada de forma recombinante a la proteína del gen III o gen VIII del fago. Como alternativa, la porción modificada de unión a FcRn de las inmunoglobulinas de la presente invención también se puede expresar en un sistema de presentación en fago. Los ejemplos de los métodos de presentación en fagos que se pueden usar para preparar inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención incluyen los desvelados en Brinkman et al., J. Immunol. Methods, 182:41-50, 1995; Ames et al., J. Immunol. Methods, 184:177-186, 1995; Kettleborough et al., Eur. J. Immunol., 24:952-958, 1994; Persic et al., Gene, 187:9-18, 1997; Burton et al., Advances in Immunology, 57:191-280, 1994; solicitud PCT n.º PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. N.º 5.698.426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5.733.743 y 5.969.108.

Tras la selección de fagos, las regiones codificantes del anticuerpo del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento deseado y se pueden expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, las técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear usando los métodos conocidos en la materia tales como los desvelados en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques, 12(6):864-869, 1992; y Sawai et al., AJRI, 34:26-34, 1995; y Better et al., Science, 240:1041-1043, 1988, los ejemplos de las técnicas que se pueden usar para producir Fvs de cadena simple y anticuerpos incluyen los descritos en la Pat. de EE.UU. N.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203:46-88, 1991; Shu et al., PNAS, 90:7995-7999, 1993; y Skerra et al., Science, 240:1038-1040, 1988.

Producción recombinante de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir de manera recombinante. Por ejemplo, el ADN que codifica un anticuerpo de la presente invención se aísla y se secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos). Una célula de hibridoma sirve como fuente preferente de dicho ADN para los anticuerpos. Una vez aislados, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra et al., Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262 (1993) y Pluckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992). Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines se conocen en la materia. Una amplia variedad de métodos de clonación y de amplificación *in vitro* son adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Los ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes como para dirigir a los expertos en la materia a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel, "Guide to Molecular Cloning Techniques", Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2ª ed.) Vol. 1 3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N.Y., (Sambrook); y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, un proyecto conjunto entre Greene Publishing

Associates, Inc. y John Wiley y Sons, Inc., (Suplemento de 1994) (Ausubel). Los métodos de producción de inmunoglobulinas recombinantes también se conocen en la materia. Véase, Cabilly, Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Queen et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 86: 10029 10033.

Para la producción recombinante, el ácido nucleico que codifica al anticuerpo preferentemente se aísla y se inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla o se sintetiza fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a los ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Muchos vectores están disponibles. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, una secuencia que codifica un anticuerpo de la presente invención o fragmento del mismo (por ejemplo, derivada de la información proporcionada en el presente documento), un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) Componente de secuencia señal. El anticuerpo de la presente invención se puede producir de manera recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir, escindida por una señal peptidasa) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal natural del anticuerpo, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o líderes estables de enterotoxina II. La para la secreción en levadura, la secuencia señal natural se puede sustituir mediante, por ejemplo, la líder de invertasa de levadura, la líder del factor α , o la líder de la fosfatasa ácida, la líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, las secuencias señal, así como las líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex, están disponibles. El ADN para dicha región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Componente promotor. Los vectores de expresión y clonación usualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está operativamente unido al ácido nucleico del anticuerpo. Los promotores adecuados para usar con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S. D.) operativamente unida al ADN que codifica el anticuerpo.

Se conocen promotores para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 bases arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola de poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias pueden insertarse adecuadamente en vectores de expresión eucarióticos. Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoasa isomerasa y glucocinasa. Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen adicionalmente en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levaduras también se usan de manera ventajosa con los promotores de levadura.

La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2). CMV, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, más preferentemente, virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

(iii) Componente del elemento potenciador. La transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención por eucariotas superiores a menudo se incrementa al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv (1982) Nature 297: 17-18 sobre elementos potenciadores para la activación de promotores de eucariotas. El potenciador puede sufrir corte y empalme en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia que codifica el anticuerpo, pero preferentemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

(iv) Componente de terminación de la transcripción. Los vectores de expresión usados en las células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanas o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/1 1026 y el vector de expresión desvelado en el presente documento.

(v) Selección y transformación de células hospedadoras. Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o la expresión del ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura o de células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen las eubacterias, tales como organismos Gram negativos o Gram positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis*, *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuadas. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes.

Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son hospedadores de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura común del panadero, es la más comúnmente usada entre los microorganismos hospedadores eucariotas inferiores. Sin embargo, una serie de otros géneros, especies y cepas están comúnmente disponibles y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y hospedadores de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de anticuerpos glucosilados derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* se han identificado. Una variedad de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-I de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y tales virus se pueden usar como el virus en el presente documento de acuerdo con la presente invención, especialmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los ejemplos de células de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al. (1977) Gen Virol. 36:59); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (CHO, Urlaub et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 77:4216); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al. (1982) Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68); células MCR 5; células FS4; y PER.C6™ (CruCell NV).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos o proteínas de fusión de IgG y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(vii) Cultivo de las células hospedadoras. Las células hospedadoras usadas para producir el anticuerpo de la presente invención se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), medio Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58:44, Barnes et al. (1980) Anal. Biochem. 102:255, las patentes de Estados Unidos N.º 4.767.704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5.122.469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Re. de Patente de EE.UU. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede completarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente.

También se pueden incluir otros suplementos necesarios a concentraciones apropiadas que conocerían los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

Anticuerpos quiméricos

El anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos quiméricos se preparan por medios recombinantes combinando las regiones variables de cadena ligera y pesada (VL y VH), obtenidas de las células productoras de anticuerpos de una especie con las regiones constantes de la cadena ligera y pesada de otro. Normalmente, los anticuerpos quiméricos utilizan las regiones variables de roedores o de conejo y las regiones constantes humanas, con el fin de producir un anticuerpo con dominios predominantemente humanos. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico comprende una región variable de un anticuerpo de ratón fusionado con una región constante humana. La producción de tales anticuerpos quiméricos se conoce en la materia, y se puede lograr por medios convencionales (tal como se describe, por ejemplo, en Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; las patentes de Estados Unidos N.º 5.807.715; 4.816.567 y 4.816.397).

Anticuerpos primatizados

El término "anticuerpo primatizado" se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes humanas. Los métodos para producir anticuerpos primatizados son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.658.570; 5,681,722; y 5.693.780.

Anticuerpos humanizados y humanos

Dentro del alcance de la invención se incluyen anticuerpos desimmunizados que tienen variaciones de secuencia producidas usando los métodos descritos en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N.º EP0983303, WO 00/34317 y WO 98/52976.

El término anticuerpos "humanos" incluye anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas tal como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.939.598. Los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo los métodos de presentación en fagos usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también el documento WO 98/46645, WO 98/24893, WO98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen con restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, uno o más restos marco de Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a los de una inmunoglobulina no humana o todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de la inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana (Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature, 332:323-329; y Presta (1992) Curr Op Struct Biol, 2: 593-59).

Los métodos para la humanización de anticuerpos no humanos se pueden realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones PT et al (1986) Nature 321(6069):522; Riechmann L et al (1988) Nature 332(6162):323-327; Verhoeyen M et al (1988) Science 239(4847):1534-1536. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman típicamente de un dominio variable "importado". Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

Los anticuerpos pueden humanizarse usando diversas técnicas conocidas en la materia, que incluyen, por ejemplo, el injerto de CDR (documento EP 239400; publicación PCT WO 91/09967; patentes de Estados Unidos n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), remodelación o acondicionamiento de superficie (documentos EP 592106; EP519596; Padlan EA et al (1991) Mol Immunol 28(4-5):489; Studnicka GM et al (1994) Protein Eng 7(6):805-14) y barajado (*shuffling*) de cadena (Patente de EE.UU. 5.565.332).

En algunos casos, los restos en las regiones marco de una o más regiones variables de la inmunoglobulina humana se sustituyen con los correspondientes restos no humanos (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. de Queen 5.585.089; las patentes de los Estados Unidos 5.693.761; 5.693.762 y 6.180.370).

La invención también se extiende a los anticuerpos humanizados de acuerdo con los métodos citados como Superhumanization® descritos en los documentos US 6.881.557 y 7.732.578. En resumen, estos métodos para anticuerpos humanizados se basan en la selección de secuencias marco de la región variable de genes de anticuerpos humanos mediante comparación de los tipos de estructuras convencionales de CDR para secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con los tipos de estructura convencional de CDR para las CDR correspondientes de una biblioteca de secuencias de anticuerpos humanos. Las regiones variables de anticuerpos humanos que tienen tipos de estructuras convencionales de CDR similares a las CDR no humanas forman un subconjunto de miembros de secuencias de anticuerpos humanos del que seleccionar secuencias marco humanas.

También se incluyen dentro del ámbito de la invención los "anticuerpos de superficie remodelada". La expresión anticuerpo de superficie remodelada se refiere a la sustitución selectiva de los restos de la región marco con los restos de la región marco humana con el fin de proporcionar una molécula xenogénica que comprende un sitio de unión a antígeno que conserva sustancialmente todas las estructuras de plegamiento de la región marco natural. Las técnicas de remodelado superficial (*veneering*) se basan en el conocimiento de que las características de unión a ligando de un sitio de unión a antígeno se determinan principalmente por la estructura y la disposición relativa de los conjuntos de CDR de la cadena pesada y ligera en la superficie de unión a antígeno. Usando las técnicas de remodelado superficial, los restos de la región marco exterior (por ejemplo, accesible al disolvente), que se encuentran fácilmente por el sistema inmunitario, se sustituyen de manera selectiva con restos humanos para proporcionar una molécula híbrida que comprende una superficie remodelada débilmente inmunogénica o sustancialmente no inmunogénica.

Los anticuerpos humanos se pueden producir usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo las bibliotecas de presentación en fago (Hoogenboom and Winter (1991) J Mol Biol, 227:381; Marks et al. (1991) J Mol Biol, 222:581). Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también son adecuadas para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al. (1991) J Immunol, 147: 86-95). De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la provocación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016.

En otra realización, los anticuerpos humanos completos se obtienen mediante la inmunización de ratones transgénicos. Uno de dichos ratones se obtiene usando la tecnología XenoMouse™ (Abgenix; Fremont, Calif) y se desvela en las Patentes de EE.UU. N.º 6.075.181; 6.091.001 y 6.114.598. Se espera que los anticuerpos humanos completos minimicen las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas para anticuerpos monoclonales de ratón o derivatizados de ratón y, por lo tanto, aumenten la eficacia y la seguridad de los anticuerpos administrados.

También se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado utilizando una técnica denominada "selección guiada". En esta solución, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se usa para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespersen et al., Biotechnology 12:899-903 (1988)).

Los anticuerpos también se pueden madurar por afinidad usando métodos de selección y/o mutagénesis tal como se conocen en la materia. Los anticuerpos madurados por afinidad tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 o 30 veces mayor que el anticuerpo de partida (generalmente de murino, humanizado o humano) a partir del que se prepara el anticuerpo.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en uno o más CDR del mismo que da como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por IL-5, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones. Marks et al (1991) J Mol Biol 222:581-597 describe la maduración por afinidad por el barajado (*shuffling*) de los dominios VH y VL.

Unión del anticuerpo

Los anticuerpos de la invención se pueden ensayar en cuanto a la unión específica mediante cualquier método conocido en la materia. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen pero sin limitación los sistemas de ensayo

competitivo y no competitivo que usan técnicas tales como el análisis BIAcore, el análisis de FACS (clasificador de células activadas por fluorescencia), inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, análisis por transferencia de Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA, inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos de radiometría inmunológica, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, etc.

Ensayos para la semivida de los anticuerpos de la invención

La semivida del anticuerpo de la invención se puede medir mediante estudios farmacocinéticos (PK) de acuerdo con el método descrito por Kim et al, Eur J of Immunol 24:542 (1994). De acuerdo con este método, las inmunoglobulinas modificadas radiomarcadas se inyectan por vía intravenosa en ratones y se mide periódicamente su concentración en plasma en función del tiempo, por ejemplo, a los 3 minutos a las 72 horas después de la inyección. La curva de eliminación obtenida de este modo debería de ser bifásica, es decir, una fase alfa y una fase beta. Para la determinación de la semivida *in vivo* de la inmunoglobulina modificada o la proteína de fusión de la invención, la tasa de eliminación en fase beta se calcula y se compara con la del anticuerpo de tipo silvestre o sin modificar.

Los estudios de PK tales como el descrito anteriormente se pueden realizar en un modelo de ratón con FcRn humanizado en donde el FcRn endógeno de murino se genomanipula por desactivación y el FcRn humano se genomanipula por activación tal como se describe en Petkova SB et al., (2006) International Immunology 18(12):1759-1769.

Recientemente se ha documentado que la semivida potenciada del anticuerpo se puede correlacionar con una mejora de la actividad *in vivo* (Zalevsky J et al., (2010) nature Biotechnology 28(2):157-159).

Con el fin de comparar la capacidad del anticuerpo modificado para unirse a FcRn con la de IgG₄ de tipo silvestre, o el anticuerpo IgG₄ modificado que comprende la modificación de la región de bisagra de IgG₄ y las modificaciones de la región constante de la cadena pesada, y el IgG₄ de tipo silvestre se puede radiomarcarse y hacer reaccionar con células que expresan FcRn *in vitro*. La radiactividad de las partes unidas a la célula se puede contar y comparar después. Las células que expresan FcRn usadas en este ensayo son preferentemente líneas celulares endoteliales que incluyen células endoteliales de capilares pulmonares de ratón (B10, D2.PCE) que provienen de los pulmones de ratones B10.DBA/2 y células endoteliales transformadas por SV40 (SVEC) (Kim et al., J. Immunol., 40:457-465, (1994)) que provienen de ratones C3H/HeJ. Sin embargo, también se pueden usar otros tipos de células tales como las de los bordes en cepillo del intestino aisladas de ratones lactantes de 10 a 14 días de vida, que expresan un número suficiente de FcRn. Como alternativa, también se pueden utilizar las células de mamífero que expresan FcRn recombinante de una especie de elección. Después de contar la radiactividad de la fracción unida de la inmunoglobulina o la proteína de fusión modificada o la de la IgG₄ de tipo silvestre, las moléculas de unión se pueden extraer después con detergente y se puede calcular y comparar el porcentaje de liberación por unidad de número de células.

La afinidad del anticuerpo modificado por el FcRn se puede medir mediante la medición por resonancia de plasmón superficial (SPR) usando, por ejemplo, un BIAcore 2000 (BIAcore, Inc) tal como se describe (Popov et al., Mol Immunol., 33:493-502 (1996); Karlsson et al., J. Immunol. Methods, 145:229-240 (1991)). En este método, las moléculas de FcRn se acoplan a una microplaca de sensor BIAcore (por ejemplo, una microplaca Cm5 por Pharmacia) y la unión de la inmunoglobulina o de la proteína de fusión modificada al FcRn inmovilizado se mide a un determinado caudal para obtener sensogramas usando el programa informático BIA evaluation 2.1, basándose en lo cual se pueden calcular las tasas de unión y desunión del anticuerpo modificado a FcRn.

Las afinidades relativas del anticuerpo modificado y la IgG₄ de tipo silvestre por FcRn también se pueden medir mediante un simple ensayo de unión competitiva. El anticuerpo modificado o la IgG₄ de tipo silvestre sin marcar se añaden en diferentes cantidades a los pocillos de una placa de 96 pocillos en la que se inmoviliza el FcRn. Después se añade a cada pocillo una cantidad constante de IgG₄ de tipo silvestre radiomarcado. Se representa gráficamente el porcentaje de radiactividad de la fracción unida frente a la cantidad de inmunoglobulina modificada/proteína de fusión sin marcar o IgG₄ de tipo silvestre y la afinidad relativa del anticuerpo modificado se puede calcular a partir de la pendiente de la curva.

Además, las afinidades del anticuerpo modificado y de la IgG₄ de tipo silvestre por FcRn también se pueden medir mediante un estudio de saturación y un análisis de Scatchard.

La transferencia de anticuerpos modificados y la IgG₄ de tipo silvestre para FcRn se pueden medir mediante ensayo de transferencia *in vitro* usando células que expresan IgG₄ y FcRn radiomarcados y comparando la radiactividad de un lado de la monocapa celular con la del otro lado. Como alternativa, dicha transferencia se puede medir *in vivo* alimentando a ratones lactantes de 10 a 14 días de vida con anticuerpo modificado y radiomarcado y contando periódicamente la radiactividad en muestras de sangre, que indica la transferencia de la IgG₄ a través del intestino a la circulación (o a cualquier otro tejido diana). Para probar la inhibición dependiente de la dosis de la transferencia de IgG a través del intestino, a los ratones se les da una mezcla de IgG₄ radiomarcada y no marcada en una proporción determinada y la radiactividad del plasma se puede medir periódicamente (Kim et al, Eur J of Immunol 24:542 (1994)).

Composiciones farmacéuticas y modos de administración

Los anticuerpos de la presente invención son útiles para la administración parenteral, tópica oral o local, la administración en aerosol o la administración transdérmica, para el tratamiento profiláctico o terapéutico. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitaria en función del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas para chupar. Se reconoce que las composiciones farmacéuticas de la presente invención, cuando se administran por vía oral, se deben de proteger de la digestión. Esto se logra típicamente bien complejando la proteína con una composición para hacerlas resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o mediante empaquetamiento de la proteína en un vehículo resistente de manera apropiada tal como un liposoma. Los medios de protección de proteínas frente a la digestión se conocen en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son particularmente útiles para la administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano o articulación. Las composiciones para administración habitualmente comprenderán una solución del anticuerpo de la presente invención disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y están generalmente libres de materia no deseada. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximar las condiciones fisiológicas tales como el ajuste del pH y los agentes tamponantes, agentes de ajuste de la toxicidad, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de anticuerpo de la presente invención en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de líquido, en las viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y con las necesidades del sujeto.

Por ejemplo, para la administración parenteral, los anticuerpos del sujeto se pueden formular en una forma de dosificación unitaria inyectable (solución, suspensión, emulsión) en asociación con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina sérica humana al 5 %. Los vehículos no acuosos tales como aceites mezclados y oleato de etilo también se pueden usar. También se pueden usar liposomas como vehículos. Los vehículos pueden contener pequeñas cantidades de aditivos que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, por ejemplo, tampones y conservantes.

Los anticuerpos de la presente invención pueden formularse para administración parenteral, por ejemplo, formulados para inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica u otras de estas vías, incluyendo la administración peristáltica y la instilación directa en un sitio de tumor o enfermedad (administración intracavitaria). Normalmente, dichas composiciones se pueden preparar como inyectables, bien como soluciones líquidas o bien como suspensiones; las formas sólidas adecuadas para su uso para preparar soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de la inyección también se pueden preparar; y las preparaciones también pueden emulsionarse.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto de que tenga jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las composiciones se pueden formular en una composición acuosa estéril en una forma neutra o de sal. Las soluciones de los anticuerpos de la presente invención como sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico o ácidos orgánicos, tales como acético, trifluoroacético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden obtenerse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos, y dichas bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Los vehículos adecuados incluyen disolventes y medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y/o mediante el uso de tensioactivos.

En condiciones normales de almacenamiento y uso, todas estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Puede lograrse la prevención de la acción de microorganismos mediante

diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. Puede lograrse la absorción prolongada de la composición inyectable mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Antes o después de la formulación, los anticuerpos de la presente invención se pueden dializar de manera extensiva para eliminar moléculas de pequeño peso molecular y/o liofilizar para una formulación más preparada en un vehículo deseado, cuando sea apropiado. Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los principios activos en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se desee, seguido de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente.

En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y de liofilización que producen un polvo de principios activos, más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución de la misma previamente esterilizada por filtración.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas de acuerdo con la invención generalmente incluirán una cantidad del anticuerpo de la presente invención mezclada con diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una solución acuosa estéril, para dar un intervalo de concentraciones finales, en función del uso pensado. Las técnicas de preparación son generalmente conocidas en la materia tal como se ejemplifica por Pharmaceutical Sciences, de Remington, 16ª edición. Mack Publishing Company, 1980. Se debería apreciar que la contaminación por endotoxinas debe mantenerse al mínimo dentro de un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

Tras la formulación, el anticuerpo de la presente invención se administrará de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal como sea terapéuticamente/profilácticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se contemplan otras formas farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas u otros sólidos para la administración oral, supositorios, pesarios, soluciones o pulverizadores nasales, aerosoles, inhaladores, formas liposomales y similares. También se pueden usar cápsulas o composiciones farmacéuticas de "liberación lenta". Las formulaciones de liberación lenta generalmente se diseñan para dar un nivel de fármaco constante sobre un período prolongado y se pueden usar para administrar anticuerpos, de la presente invención.

En algunas realizaciones, los liposomas y/o las nanopartículas también se pueden emplear con los principios activos. La formación y el uso de liposomas es generalmente conocida por los expertos en la materia. Los liposomas se pueden formar a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares (denominadas también vesículas multilamelares (MLV). Las MLV pueden tener generalmente diámetros desde 25 nm a 4 µm. La sonicación de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 angstrom, que contienen una solución acuosa en el núcleo. Los fosfolípidos pueden formar una variedad de estructuras que no sean liposomas cuando se dispersan en el agua, en función de la proporción molar de lípido a agua. A bajas proporciones, el liposoma es la estructura preferida. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes. Los liposomas pueden presentar una baja permeabilidad a sustancias iónicas y polares, pero a elevadas temperaturas experimentan una fase transicional que altera notablemente su permeabilidad. La transición de fase implica un cambio de una estructura estrechamente empaquetada y ordenada, conocida como estado de gel, a una estructura holgada y menos ordenada, conocida como estado de fluido. Esto tiene lugar a una temperatura de transición de fase característica y da como resultado un aumento en la permeabilidad a iones, azúcares y fármacos.

Las nanocápsulas pueden generalmente atrapar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Las nanopartículas biodegradables de polialquilcianoacrilato que cumplen estos requisitos se contemplan para su uso en la presente invención, y dichas partículas se pueden preparar fácilmente.

La Publicación Internacional N.º WO2002/080967 describe composiciones y métodos para administrar composiciones en forma de aerosol que comprenden anticuerpos para el tratamiento de, por ejemplo, asma, que también son adecuadas para la administración de un anticuerpo de la presente invención.

La dosificación del anticuerpo de la invención se puede determinar por un experto en la materia. La dosificación dependerá, sin embargo, del grado al que la semivida *in vivo* de la inmunoglobulina o proteína de fusión modificada se haya aumentado. Además, la dosificación y frecuencia de administración de los anticuerpos o proteínas de fusión de acuerdo con la invención se pueden disminuir también mejorando la captación y la penetración tisular (por ejemplo, en los pulmones) mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

El tratamiento con los anticuerpos de la invención incluye el tratamiento único o una serie de tratamientos. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes o una vez cada seis semanas.

Uso de anticuerpos modificados

Los anticuerpos modificados en la presente invención se pueden usar para diversos fines no terapéuticos. Se pueden usar como un agente de purificación por afinidad. También pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico, tales como expresión de la detección de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero. Para aplicaciones de diagnóstico, los anticuerpos típicamente se marcarán con un resto detectable, incluyendo los radioisótopos, marcadores fluorescentes y diversos marcadores de sustrato enzimático. Los anticuerpos también se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, los anticuerpos se marcan con un radionucleótido para que el antígeno o la célula que lo expresa se pueda localizar usando la inmunoscintigrafía.

Uso de anticuerpos anti-IL-5 en terapia

Una característica general en la patogénesis de asma y otras enfermedades alérgicas crónicas ha demostrado ser los números elevados de eosinófilos, especialmente en la mucosa bronquial de los pulmones. Tras la activación, los eosinófilos secretan una serie de mediadores que están implicados activamente en la respuesta inflamatoria de las vías aéreas. En la activación de los eosinófilos, la interleucina 5 (IL-5) desempeña un papel importante.

IL-5 es una citocina hallada en muchas especies de mamífero, y entre otras, tanto el gen humano como el de murino para IL-5 se han clonado. El gen humano consiste en cuatro exones con tres intrones colocados en el cromosoma 5 y codifica una secuencia líder de N-terminal de 134 aminoácidos. La IL-5 activa es un homodímero y la estructura en 3 dimensiones de la hIL-5 se ha determinado mediante cristalografía de rayos X. El receptor para IL-5 está principalmente presente en eosinófilos y se compone de una cadena alfa y una cadena beta. La cadena alfa del receptor es específica para IL-5 y la cadena beta, que asegura la unión de alta afinidad y la transducción de la señal, se comparte con los receptores heterodiméricos para IL-3 y GM-CSF.

IL-5 se secreta principalmente por linfocitos Th2, mastocitos y eosinófilos completamente diferenciados. Se ha demostrado que actúa sobre los eosinófilos, basófilos, linfocitos T citotóxicos y linfocitos B de murino.

La acción de la IL-5 sobre los eosinófilos incluye la quimiotaxis, la adhesión mejorada a células endoteliales, y la activación de la diferenciación terminal de las células. Además, se ha demostrado que la IL-5 evita la apoptosis de los eosinófilos maduros. Estos hallazgos han contribuido al concepto de que la IL-5 es la citocina más importante para la diferenciación de los eosinófilos.

Mientras que el tratamiento de asma actual implica corticosteroides, se prevé que el futuro tratamiento de asma así como otras afecciones mediadas por los eosinófilos incluirán anticuerpos anti-IL-5. La secreción inapropiada de citocinas y otras moléculas efectoras de los eosinófilos provoca el daño y la disfunción del tejido circundante. El daño al órgano terminal resultante de la infiltración y activación de los eosinófilos representa un componente patógeno común de varias enfermedades, incluyendo enfermedades atópicas y síndromes hipereosinófilos (HES). Hay claramente una necesidad de terapias que reducen el número de eosinófilos en humanos.

Anticuerpos de la invención en el tratamiento o la prevención de trastornos

Los anticuerpos modificados tienen diversas aplicaciones terapéuticas. Los anticuerpos modificados se pueden usar para tratar a un sujeto que padece o predispuesto a, una enfermedad o trastorno, que podría beneficiarse de la administración de los anticuerpos modificados. Las afecciones que se pueden tratar con los anticuerpos incluyen afecciones inflamatorias tales como asma; y enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes incluyen, pero sin limitación, enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunes del oído, enfermedades autoinmunes del ojo tales como uveítis, hepatitis autoinmune, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, colitis ulcerosa y vasculitis.

La presente invención también incluye métodos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la eosinofilia. El asma es una diana principal para el método de la invención, pero también otras afecciones crónicas tales como alergia múltiple, rinitis alérgica y esofagitis eosinófila, son dianas adecuadas para el tratamiento. Por lo tanto, una realización del método de la invención comprende el tratamiento y/o la prevención y/o la mejora del asma u otras afecciones alérgicas crónicas caracterizadas por la eosinofilia que comprenden la administración de un anticuerpo anti-IL-5 que regula por disminución la actividad de la IL-5 hasta tal punto en el que el número de eosinófilos se reduce significativamente.

En el presente contexto, una reducción significativa en los números de eosinófilos es al menos del 20 % en comparación con el número de eosinófilos del tratamiento de la técnica anterior, pero se contemplan porcentajes mayores, tal como al menos el 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % e incluso al menos el 90 %. La reducción puede ser sistémica o, más a menudo local, por ejemplo, en los pulmones.

El número de eosinófilos se determina mediante los métodos conocidos en la materia, normalmente usando la microscopía de una muestra adecuada de fluido de lavado broncoalveolar (BAL) y contando el número de eosinófilos de forma manual al microscopio. Como alternativa, el número de eosinófilos se puede contar usando citometría de flujo capaz de distinguir los eosinófilos.

Utilidad de los anticuerpos no inmunoestimulantes

Los anticuerpos de la invención comprenden una región Fc de IgG4 humana o un dominio de unión a FcRn de la misma y una secuencia de región de bisagra central de IgG4 humana. Es sabido en la materia que el isotipo del dominio constante del anticuerpo influye en las funciones efectoras del anticuerpo. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, solo la IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas son conocidas por activar el complemento; y la IgG1 y la IgG3 humana median la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de manera más eficaz que la IgG2 y la IgG4. Dado que las inmunoglobulinas y las proteínas de fusión de la presente invención comprende las secuencias de la región constante de IgG4, son incapaces de activar la cascada del complemento o la actividad ADCC y, por lo tanto, cualquier activación de células NK o de linfocitos T indeseable. Por consiguiente, son particularmente susceptibles a afecciones alérgicas tales como asma en donde no es deseable provocar la activación de células que solo pueden exacerbar la afección.

Los anticuerpos IgG4 difieren funcionalmente de otras subclases de IgG en su actividad antiinflamatoria, que incluye una mala capacidad para inducir el complemento y la activación celular debido a la baja afinidad por C1q (el fragmento q del primer componente del complemento) y los receptores gamma de Fc. En consecuencia, la IgG4 se ha convertido en la subclase preferida para la inmunoterapia, en la que el reclutamiento de la función efectora del hospedador es indeseable.

Anticuerpos anti-IL-5

La presente invención se extiende a anticuerpos que comprenden secuencias de la región variable de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos de IL-5 conocidos unidos a una región Fc de IgG4 humana modificada y a una región de bisagra de IgG4 humana modificada de acuerdo con la presente invención. Se describen varios ejemplos de anticuerpos anti-IL-5 en los documentos 5.683.892, US 5.693.323, US 5.783.184, US 5.851.525, US 6.129.913, US 5.096.071, US 6.056.957 y US 6.451.982. Además, los anticuerpos anti-IL-5 humanizados CTIL-5-10 gH/-gL6 (tal como se describen en el documento US RE39.548E), citados en el presente documento como 39D10 o hu39D10), y mepolizumab son particularmente adecuados para la modificación de acuerdo con la presente invención.

Los expertos en la materia apreciarán que se pueden hacer numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención tal como se muestra en las realizaciones específicas sin alejarse del ámbito de la invención tal como se describe ampliamente. Las presentes realizaciones, por lo tanto, se deben considerar en todos los aspectos como ilustrativas y no como restrictivas.

Efecto sinérgico de las sustituciones

Los presentes inventores han descubierto que las sustituciones YTE (es decir, las mutaciones M252Y, S254T y T256E) en una inmunoglobulina IgG4 o región Fc del anticuerpo, cuando se combina con la mutación de la región de bisagra S228P en un anticuerpo IgG4, aumenta sinérgicamente la semivida del anticuerpo IgG4 modificado *in vivo*. Esto se demostró para dos anticuerpos diferentes que se unen a dos antígenos diferentes no relacionados, como se describe en los ejemplos.

En particular, los inventores descubrieron que mientras que las sustituciones YTE aumentaron la afinidad de los anticuerpos modificados por el FcRn humano, la inclusión adicional de la modificación S228P a la región de bisagra no produjo efectos adicionales sobre la afinidad del anticuerpo por el FcRn. Esto no es del todo inesperado dado que esta región no interactúa con el FcRn. Por lo tanto, se habría predicho que no habría sinergia con respecto a la sustitución S228P y las sustituciones YTE. Debido a que cualquier modificación en un fármaco basado en proteína humana (incluyendo una proteína que comprende una región constante de anticuerpo humano) aumenta el riesgo de inducir una respuesta inmunitaria anti-fármaco en un paciente, la práctica general es limitar el número de dichas mutaciones para limitar el riesgo presumiblemente aditivo de cada mutación con respecto a inducir tales respuestas inmunitarias frente al fármaco. Sin embargo, debido a los sorprendentes resultados descritos en el presente documento, esa combinación de dos clases de modificaciones (modificaciones de Fc y modificaciones de bisagra) da como resultado un efecto supra-aditivo en el aumento de la semivida en circulación de los anticuerpos IgG4, los beneficios de combinar estas dos clases de mutaciones pueden superar las desventajas teóricas en relación con el aumento de la incidencia de promover reacciones inmunitarias antifármaco. Las ventajas de aumentar la semivida de

una molécula serán inmediatamente evidentes para el experto en la materia. Tales beneficios incluyen una menor dosificación y/o frecuencia de administración que reduce el riesgo de eventos adversos en un sujeto y reduce el coste. Por consiguiente, tales inmunoglobulinas con una semivida aumentada son de importancia farmacéutica significativa.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende", o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, un número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

10 Cualquier tratamiento de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se hayan incluido en la presente memoria descriptiva no debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimientos generales comunes en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

15 EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Generación de hu39D10 y sus variantes

20 El gen que codifica la región constante de la cadena pesada de la IgG4 humana se aisló de la biblioteca de ADNc Quickclone (Clontech, Mountain View, CA) y se clonó en el vector de expresión pTT5 (Durocher et al, Nucleic Acids Research vol 30, N.º 2, pp e9). Para introducir las mutaciones descritas anteriormente en el dominio Fc, se sintetizó un conjunto de dos cebadores de secuencia complementaria con una o más mutaciones y se usó para la mutagénesis de sitio dirigido basada en PCR. El vector de expresión de Ig kappa se construyó por medios similares. Los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables hu39D10 (Figura 1) se diseñaron de forma inversa a partir de las secuencias de proteína publicadas (documento US RE39.548E) usando 18 oligonucleótidos (cadena pesada) o 16 (cadena ligera) mediante ensamblaje de genes basado en PCR. Los fragmentos se clonaron en vectores de expresión usando sitios de restricción integrados en los vectores para la clonación. La secuencia de aminoácidos final para las cadenas pesada y ligera de hu39D10 se muestra en la Figura 1. La figura también muestra la secuencia de hu39D10 con las 4 sustituciones de aminoácidos (YTE+S228P, SEQ ID NO:6).

Expresión y purificación de hu39D10 y variantes

35 Los vectores de expresión pTT5 para hu39D10 y sus variantes se transfectaron a células HEK293 6E de acuerdo con Durocher et al, Nucleic Acids Research vol 30, N.º 2, pp e9. Después de 6 días de la transfección, el medio de cultivo se aisló y después se sometió a purificación por afinidad usando perlas de proteína G-agarosa (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

Generación de construcciones de expresión del complejo FcRn/microglobulina β_2

40 Los fragmentos de ADN que codifican el FcRn humano y la microglobulina β_2 se aislaron de ADNc sintetizado con la ARN Universal (BioChain, Hayward, CA), un grupo de ARN total humano, usando un kit Superscript III First-strand Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, CA). El dominio extracelular de FcRn (24-290 aminoácidos) y la parte madura de la microglobulina β_2 (21-119 aminoácidos) se clonaron en el vector de expresión pTT5 de manera individual. Las secuencias del dominio extracelular FcRn humano y la microglobulina β_2 se muestran en la Figura 2 y en la Figura 3, respectivamente.

Expresión y purificación del complejo FcRn/microglobulina β_2

50 Los vectores de expresión pTT5 para la producción de FcRn y microglobulina β_2 humana se cotransfectaron en células HEK293 6E. Seis días después de la transfección, el medio de cultivo se aisló y después se sometió a purificación por afinidad usando perlas de IgG-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

ELISA para medir la afinidad de hu39D10 y variantes para el complejo FcRn/microglobulina β_2

55 Las placas Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) se recubrieron con 5 ug/ml de anticuerpo monoclonal anti-microglobulina β_2 . Los pocillos se lavaron después con PBS y se trataron con solución de bloqueo Superblock (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Después, el complejo FcRn/microglobulina β_2 se diluyó a 5 ug/ml en SPBS6T (tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 6,0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05 %) y se añadió para permitir la captura por el anticuerpo anti-microglobulina β_2 recubierto durante 60 min a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron después con SPBS6T y después se expusieron a hu39D10 o sus variantes en SPBS6T y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. El complejo hu39D10/FcRn formado por la incubación se probó con un fragmento F(ab')₂ de un conjugado anti-kappa humana HRP (SouthernBiotechnology, Birmingham, AL; dilución a 1/5000 en SPBS6T) durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar con SPBS6T, se cargaron 100 ul de TMB (Sigma) en cada pocillo para la detección de la señal. Después, se añadieron 50 ul de ácido sulfúrico 2 N para detener el

desarrollo del color, y después se midió la A450 en un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La afinidad de las variantes de IgG para FcRn se calculó y se representó gráficamente usando el programa informático Prism por GraphPad Software (La Jolla, CA).

5 Resultados y conclusiones

Como se muestra en la Figura 4, la afinidad de hu39D10 por el FcRn humano ($CE_{50} = 3,8$ nM) aumentó en 4,7 veces haciendo las mutaciones YTE (a $CE_{50} = 0,81$ nM). La adición adicional de la mutación S228P no tuvo efecto sobre la afinidad del FcRn ($CE_{50} = 0,81$ nM, la misma que para hu39D10 con las mutaciones YTE). Este resultado no fue inesperado dado que la mutación S228P está muy lejos de la región de Fc que interactúa con el FcRn. Basándose en los resultados, no se debería de esperar ningún efecto sinérgico entre las mutaciones YTE y S228P sobre la semivida en circulación.

EJEMPLO 2

Estudio PK

El estudio PK en ratón se realizó por el Jackson Laboratory - West (Sacramento, CA) con ratones que tienen su FcRn endógeno genomanipulado por desactivación pero tienen el FcRn humano genomanipulado por activación (el modelo de ratón hemigénico 4919 Tg276 descrito en Petkova et al, (2006) International Immunology vol. 18, N.º 12, págs. 1759-1769). En el día 0, siete ratones en cada grupo recibieron hu39D10 o sus variantes por vía intraperitoneal (IP) (200 ug). A cada ratón se le extrajo sangre del seno retroorbital a las 2, 12, 24 horas y a los 2, 4, 7, 10, 14, 18, 21 y 28 días para preparar las muestras de plasma.

ELISA para medir hu39D10 y las variantes en muestras de plasma

Las placas Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) se recubrieron con IL-5 recombinante (el antígeno hu39D10; R&D Systems, Minneapolis, MN) a 2 ug/ml en PBS toda la noche en un refrigerador. Los pocillos se lavaron después con PBS y se bloquearon con 200 ul de solución de bloqueo Superblock (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) durante 30 min para minimizar la unión inespecífica. Las muestras de plasma se diluyeron después a 1/50 en PBS-Tween20 (PBST) y se cargaron en los pocillos recubiertos con IL-5. Además, un patrón de hu39D10 recombinante se diluyó en PBST con suero de ratón al 2 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se cargaron en pocillos recubiertos para generar una curva patrón para la cuantificación. Después de una incubación de 60 min a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con PBST y después se añadió un conjugado anti-Fc humano-HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, dilución de 1/1000 en PBST) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron después con PNST. Para la detección de la señal, se cargaron 100 ul de TMB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en cada pocillo. Después, se añadieron 50 ul de ácido sulfúrico 2 N para detener el desarrollo del color, y después se midió la A450 en un lector de placa Vmax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). La concentración de hu39D10 y las variantes en el plasma se calculó usando el programa informático Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) y usando la curva patrón de hu39D10. Para cada ratón, la concentración relativa de hu39D10 comparada con la concentración medida en el día 1 (definida como el 100 %) se representó gráficamente en función del tiempo. La semivida de hu39D10 o sus variantes en animales individuales también se calculó usando el programa informático, suponiendo una caída exponencial y una asíntota de cero. Para el cálculo de la semivida de la variante con mutaciones combinadas (S228P + YTE), dos resultados atípicos (que son los resultados de dos de los ratones), que aumentan la semivida calculada, se excluyeron para el cálculo de la semivida promedio.

Resultados y conclusiones

Como se muestra en la Figura 5, la semivida de hu39D10 en el suero con la mutación S228P ($t_{1/2} = 6,5$ días) se aumentó al 42 % en comparación con hu39D10 con Fc sin modificar ($t_{1/2} = 4,6$ días). Las mutaciones YTE también muestran la mejora significativa de la semivida en suero del 75 % ($t_{1/2} = 8,0$ días). Sorprendentemente, cuando se combinan, las mutaciones S228P e YTE prolongan adicionalmente la semivida en circulación de manera sinérgica (a $t_{1/2} = 13,3$ días). La adición de la mutación S228P a las mutaciones YTE aumentó la semivida en circulación al 66 % (o en 5,3 días) en relación con la YTE solo, mientras que el aumento de la semivida de S228P en el contexto de IgG4 no mutada por YTE dio como resultado solo un aumento del 42 % (1,9 días). Sin sinergia entre las mutaciones S228P e YTE, la mutación S228P habría causado el mismo o un aumento proporcional reducido en la semivida en el contexto de hu39D10 mutado por YTE como lo hace en el contexto de hu39D10 no mutado por YTE, produciendo una semivida de no más de 11 días para hu39D10 con ambas mutaciones, YTE y S228P.

Debido a esta sinergia, se concluye que es beneficioso combinar las mutaciones YTE y S228P en la misma molécula con el fin de lograr una semivida más larga para un fármaco basado en anticuerpo (o proteína de fusión de Fc), a pesar de la mayor posibilidad de promover respuestas inmunitarias antifármaco debido a un mayor número de mutaciones en la región constante de Fc.

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

Materiales y métodos*Generación de huMab195 y sus variantes de Fc*

Los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo huMab195 de unión a CD33 (Figura 6) se diseñaron de forma inversa a partir de las secuencias de proteína publicadas (documento US 5.693.761) usando 18 oligonucleótidos (cadena pesada) y 18 (cadena ligera) mediante ensamblaje de genes basado en PCR. Después se clonaron los fragmentos de la región variable de la cadena pesada y ligera en los vectores de expresión de la IgG4 humana (natural y variante) descritos en la sección anterior para crear una versión de IgG4/kappa de huMab195, con la secuencia del dominio constante de IgG4 natural o versiones que contienen la mutación S228P, las mutaciones YTE o tanto la mutación S228P como las mutaciones YTE. La secuencia de la cadena pesada de la IgG4 huMab195 con ambas mutaciones S228P e YTE se muestra en la Figura 6, como en la secuencia de la cadena ligera.

Expresión y purificación de huMab195 y variantes

Los vectores de expresión pTT5 para huMab195 y sus variantes se transfectaron a células HEK293 6E con el fin de producir diversas proteínas IgG4, tal como se describe en el Ejemplo 2. Estas proteínas se purificaron después usando las perlas de Proteína G-agarosa como en el Ejemplo 2.

Generación del dominio extracelular CD33 humano

Un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular CD33 humano (hCD33 ECD, 1-258 aminoácidos, incluyendo la secuencia líder) se amplificó a partir de la biblioteca de ADNc humano Quickclone (Clontech, Mountain View, CA). El ADN que codifica un marcador (His)₆ seguido por un sitio de escisión de trombina (Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser) se añadió al extremo 3' del fragmento de ECD de hCD33 mediante PCR usando un cebador que lleva estas secuencias. El fragmento de ADN que codifica la ECD de hCD33 marcado con his6 se unió después al fragmento de ADN que codifica el Fc de IgG1 de humano mediante PCR (ECD de hCD33-Fc) y se clonó en el vector de expresión pTT5. La secuencia de proteínas de ECD de hCD33-Fc se muestra en la Figura 7.

Expresión y purificación del dominio extracelular de CD33 humano

El vector de expresión pTT5 que codifica la proteína de fusión ECD de hCD33-Fc se transfectó en células HEK293 6E, y después el medio de cultivo se aisló y se sometió a la purificación por afinidad usando perlas de Proteína G-agarosa (GE Healthcare Sciences, Piscataway, NY). Para aislar la ECD de hCD33, la proteína de fusión purificada se trató con trombina (EMD Chemicals, San Diego, CA) para eliminar la parte de Fc. Después, la ECD de hCD33 se aisló mediante cromatografía de afinidad en NiNTA-agarosa (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

Estudio PK

El estudio PK en ratón se realizó por el Jackson Laboratory - West (Sacramento, CA) con ratones que tienen su FcRn endógeno genomanipulado por desactivación pero tienen el FcRn humano genomanipulado por activación (el modelo de ratón hemigénico 4919 Tg276 descrito en Petkova et al, International Immunology vol. 18, N.º 12, págs. 1759-1769). En el día 0, siete ratones en cada grupo recibieron huMab195 o sus variantes por vía intraperitoneal (IP) (200 ug). A las 2, 12 y 24 horas y a los 2, 4, 7, 10, 14 días tras la administración, se extrajo sangre de cada ratón para preparar las muestras de plasma.

ELISA para medir huMab195 y las variantes en muestras de plasma

Las placas Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY) se recubrieron con ECD de hCD33 recombinante a 2 ug/ml en solución de PBS. Los pocillos se lavaron después con PBS y se bloquearon con solución de bloqueo Superblock (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). Las muestras de plasma se diluyeron a 1/50 en PBS-Tween20 (PBST) y después se cargaron en los pocillos recubiertos con ECD de hCD33. En paralelo, las concentraciones conocidas de patrones de huMab195 recombinante se diluyeron en PBST con suero de ratón al 2 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se cargaron en pocillos recubiertos para generar una curva patrón para la cuantificación. Después de una incubación de 60 min a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron con PBST y después se añadió un conjugado anti-fragmento kappa humano-HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA; dilución a 1/2000 in PBST) y se incubó durante 30 min. Tras lavar los pocillos, se desarrollaron las señales, se midieron y se analizaron tal como se describe en el Ejemplo 2.

Resultados y conclusiones

Como se muestra en la Figura 8, la semivida del huMab195 en el suero con la mutación S228P (t_{1/2} = 2,0 días) se aumentó al 26 % en comparación con el huMab195 con Fc sin modificar (t_{1/2} = 1,6 días). Las mutaciones YTE también muestran la mejora significativa de la semivida en suero del 110 % (t_{1/2} = 3,4 días). Cuando se combinaron las mutaciones S228P e YTE, la semivida se aumentó adicionalmente a 14 días, un aumento del 312% en comparación con la variante de YTE. Sin sinergia, el aumento máximo a partir de la adición de la mutación S228P al huMab195 que

contiene YTE sería del 26 %, dando como resultado una semivida de 4,3 días, que es significativamente más corta que los 14 días observados. Este segundo ejemplo confirma la observación de que las modificaciones S228P e YTE a los anticuerpos IgG4 humanos son sinérgicas con respecto a su efecto sobre el aumento de las semividas en circulación de los anticuerpos IgG4 en sujetos con un FcRn humano. Tal sinergia puede justificar el uso de estas dos modificaciones en la misma proteína, a pesar del potencial del aumento de la inmunogenicidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Cephalon Australia Pty Ltd

<120> Anticuerpo modificado con semivida mejorada

<130> 511513

15 <150> 61/425858

<151> 22/12/2010

<160> 15

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Cys Pro Ser Cys Pro

1 5

30 <210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> secuencia de la región variable y de la región constante de la cadena pesada de hu39D10

<400> 2

40

ES 2 720 136 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	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asn	20	25	30	
Ser	Val	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Gly	Leu	Ile	Trp	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Ile	Lys	50	55	60	
Ser	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Ser	Thr	Val	Tyr	Leu	65	70	75	80
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85	90	95	
Arg	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	100	105	110	

ES 2 720 136 T3

Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala		
		115					120					125					
Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu		
	130					135					140						
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
145					150					155					160		
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
				165					170					175			
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
			180					185					190				
Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
		195					200					205					
Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser		
	210					215					220						
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro		
225					230					235					240		
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr		
				245					250					255			
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn		
			260					265					270				
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg		
		275					280					285					
Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val		
	290					295					300						
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser		
305					310					315					320		
Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys		
				325					330					335			
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu		
			340					345					350				
Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe		
		355					360					365					

ES 2 720 136 T3

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

<210> 3
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

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

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

ES 2 720 136 T3

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 4

<211> 327

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada

<400> 4

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

ES 2 720 136 T3

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

ES 2 720 136 T3

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5

<211> 327

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada

<400> 5

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

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

ES 2 720 136 T3

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

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

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 6
<211> 327
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada

<400> 6

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

ES 2 720 136 T3

Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	Lys	Thr	65	70	75
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	100	105	110
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	115	120	125
Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	130	135	140
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	145	150	155
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	165	170	175
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	180	185	190
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	195	200	205
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	210	215	220
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	225	230	235
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	245	250	255
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	260	265	270

ES 2 720 136 T3

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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 Leu Ser Leu Thr Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Thr Val Tyr Leu
65 70 75 80

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

Arg Glu Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 214
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia del dominio variable de la cadena pesada de hu39D10

<400> 8

ES 2 720 136 T3

```

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

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

Ser Gly Ser Ala Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Lys Phe Pro Asn
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

<210> 9
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 720 136 T3

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

ES 2 720 136 T3

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu
260 265

<210> 10
<211> 99
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia del dominio maduro de la microglobulina beta-2 humana
<400> 10

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 11
<211> 443
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de la región variable de la cadena pesada de huMab195 y de la región constante y de bisagra de la IgG4 modificada

<400> 11

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

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

ES 2 720 136 T3

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

ES 2 720 136 T3

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

<210> 12

<211> 218

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de los dominios variable y constante de la cadena ligera de huMab195

<400> 12

ES 2 720 136 T3

```

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

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

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

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly 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 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
          85           90           95

Glu Val Pro Trp 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

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> 13

<211> 481

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la fusión del dominio Fc extracelular de CD33 humano

<400> 13

ES 2 720 136 T3

Tyr	Tyr	Asp	Lys	Asn	Ser	Pro	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu	Gly
		35					40					45			
Ala	Ile	Ile	Ser	Arg	Asp	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Lys	Leu	Asp	Gln
	50					55					60				
Glu	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Gln	Gly	Arg	Phe	Arg	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro
65					70					75					80
Ser	Arg	Asn	Asn	Cys	Ser	Leu	Ser	Ile	Val	Asp	Ala	Arg	Arg	Arg	Asp
				85					90					95	
Asn	Gly	Ser	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Arg	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Ser
			100					105					110		
Tyr	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Ser	Val	His	Val	Thr	Asp	Leu	Thr	His	Arg
		115					120					125			
Pro	Lys	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Pro	Gly	His	Ser	Lys	Asn
	130					135					140				
Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Thr	Pro	Pro	Ile
145					150					155					160
Phe	Ser	Trp	Leu	Ser	Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Leu	Gly	Pro	Arg	Thr	Thr
				165					170					175	
His	Ser	Ser	Val	Leu	Ile	Ile	Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp	His	Gly	Thr
			180					185					190		
Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Lys	Phe	Ala	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Thr	Glu
		195					200					205			
Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	Val	Thr	Tyr	Val	Pro	Gln	Asn	Pro	Thr	Thr
	210					215					220				
Gly	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Ser	Gly	Lys	Gln	Glu	Thr	Arg	Ala	Gly
225					230					235					240
Val	Val	Ala	Gly	His	His	His	His	His	His	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser
				245					250					255	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
			260					265					270		
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
		275					280					285			

ES 2 720 136 T3

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
290 295 300

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
305 310 315 320

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
325 330 335

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
340 345 350

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
355 360 365

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
370 375 380

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
385 390 395 400

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
405 410 415

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
420 425 430

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
435 440 445

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
450 455 460

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
465 470 475 480

Lys

<210> 14

<211> 221

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de la parte de bisagra-Fc de la cadena pesada de IgG4 con mutaciones S228P e YTE y que carece de la lisina de C-terminal

<400> 14

ES 2 720 136 T3

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

<210> 15
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

ES 2 720 136 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que se une específicamente a interleucina (IL)-5 que comprende:

- (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat; y
(ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana modificada para comprender la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat;

en donde la combinación de modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo de la semivida *in vivo* del anticuerpo de interleucina (IL)-5 modificado en comparación con los correspondientes anticuerpos que tienen (i) o (ii) solo.

2. Un anticuerpo aislado que se une de manera específica a interleucina (IL)-5, que comprende:

- (i) una región Fc de IgG4 humana o el dominio de unión al FcRn del mismo modificado con respecto a una correspondiente región Fc de IgG4 o dominio de unión a FcRn de la misma no modificada para comprender las sustituciones de aminoácidos M252Y, S254T y T256E numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat; y
(ii) una secuencia de la región de bisagra central de IgG4 humana modificada para comprender la sustitución de aminoácidos S228P de acuerdo con el índice EU como en Kabat;

para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno caracterizado por una producción excesiva de eosinófilos,

en donde la combinación de modificaciones da como resultado un alargamiento supra-aditivo de la semivida *in vivo* del anticuerpo de interleucina (IL)-5 modificado en comparación con los correspondientes anticuerpos que tienen (i) o (ii) solo.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o el anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es quimérico, humanizado, humano, con CDR injertada, primatizado, desinmunizado, remodelado en superficie o biespecífico.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o para su uso de acuerdo con 2, que comprende la secuencia de la región constante de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de la región variable de la cadena pesada establecida en la SEQ ID NO:7.

5. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 4 que comprende adicionalmente una cadena ligera que comprende las secuencias de la región variable y constante establecidas en la SEQ ID NO:8.

6. El anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el trastorno se selecciona del grupo que consiste en asma atópica, dermatitis atópica, rinitis alérgica, rinitis no alérgica, asma, asma grave, neumonía eosinófila crónica, aspergilosis broncopulmonar alérgica, enfermedad celíaca, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de eosinofilia-mialgia, síndrome hipereosinófilo, reacciones edematosas incluyendo angiodema episódico, infecciones helmínticas, dermatitis oncocercal, esofaguitis eosinófila, gastritis eosinófila, gastroenteritis eosinófila, enteritis eosinófila, colitis eosinófila, micropoliposis nasal, poliposis nasal, asma por intolerancia a la aspirina, apnea del sueño obstructiva, asma crónica, enfermedad de Crohn, esclerodermia, fibrosis endomiocárdica y enfermedad autoinmune.

7. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5.

8. Una célula transformada que comprende el ácido nucleico que codifica un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7.

9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-5, proporcionado en una composición farmacéutica junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Secuencia de la región constante y variable de la cadena pesada de hu39D10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGLSLTNSVNWIRQAPGKGLEWVGLIWSNGDTD
YNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYGYFDYWGQGTLLTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:2)

Secuencia de la región constante de la IgG4 humana natural

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:3)

Secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada (S228P)

(en subrayado y en negrita: restos de aminoácidos sustituidos)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:4)

Secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada (YTE)

(en subrayado y en negrita: restos de aminoácidos sustituidos)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:5)

Secuencia de la región constante de la IgG4 humana modificada (S228P + YTE)

(en subrayado y en negrita: restos de aminoácidos sustituidos)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVTVTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP**P**CPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTL**YITRE**PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLF
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:6)

FIGURA 1

Secuencia del dominio variable de la cadena pesada de hu39D10

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGLSLTNSVNWIRQAPGKGLEWVGLIWSNGDTD
YNSAIKSRFTISRDTSKSTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYYGYFDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:7)

Secuencia del dominio variable y constante de la cadena ligera de hu39D10

(el dominio constante está subrayado)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCLASEGSSYLAWYQQKPGKAPKLLIYGANSLOQTGV
PSRFGSGSATDYTLTISSLQPEDFATYYCQQSYKFPNTFGQGTKVEVKRTVAAPSVE
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:8)

FIGURA 1 (cont)

Secuencia del dominio extracelular de FcRn humano

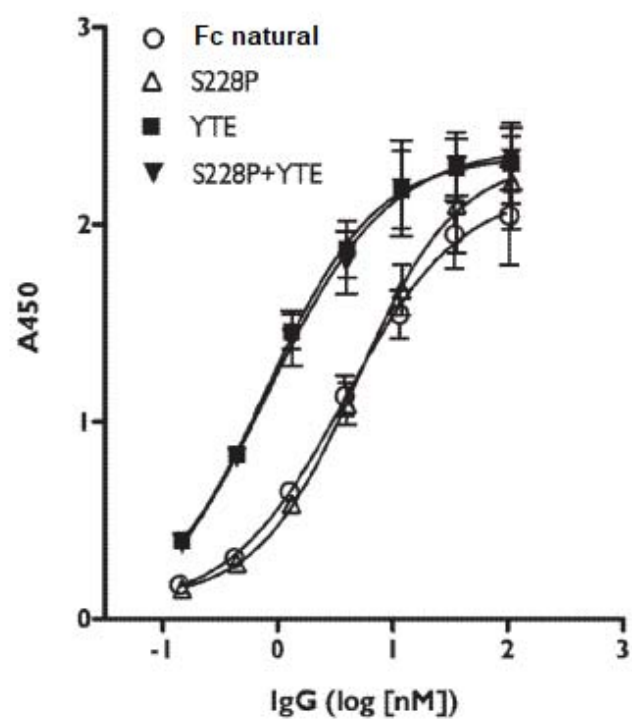
AESHLSELLYHLTAVSSPAPGTPAFWVSGWLGPQQYLSYNSLRGEAEPCGAWVWENQVS
WYWEKETTDLRIKEKLFLEAFKALGGKGPYTLQGLLGCELGPDNTSVPTAKFALNGEE
FMNFDLKQGTWGGDWPEALAISQRWQQQDKAANKELTFLLFSCPHRLREHLERGRGNL
EWKEPPSMRLKARPSSPGFSVLTCSAFSFYPPELQLRFLRNGLAAGTGQGDFGPNSDG
SFHASSSLTVKSGDEHHYCCIVQHAGLAQPLRVEL (SEQ ID NO:9)

FIGURA 2

Secuencia del dominio maduro de la microglobulina $\beta 2$ humana

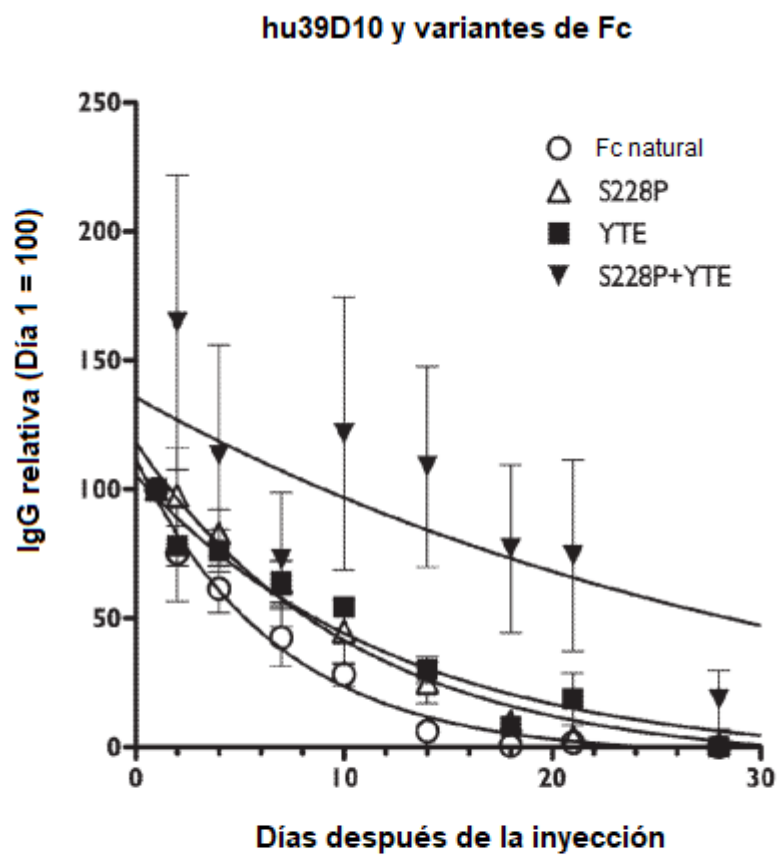
IQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSK
DWSFYLLYYTEFTPTTEKDEYACRVNHVTLSPKIVKWRDM (SEQ ID NO:10)

FIGURA 3



	Fc natural	S228P	YTE	S228+YTE
CE50 (nM)	3,8	4,9	0,81	0,81

FIGURA 4



	Fc natural	S228P	YTE	S228+YTE
t1/2 (Día)	4,6	6,5	8,0	13,3

FIGURA 5

Secuencia de la región variable de la cadena pesada de huMab195 y versión de IgG4 de la región constante con mutaciones S228P e YTE

(en negrita y subrayado: restos de aminoácidos sustituidos)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTLLVTVSS
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVTVFSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLTP
PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRL
TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK (SEQ ID NO:11)

Secuencia de los dominios variable y constante de la cadena ligera de huMab195

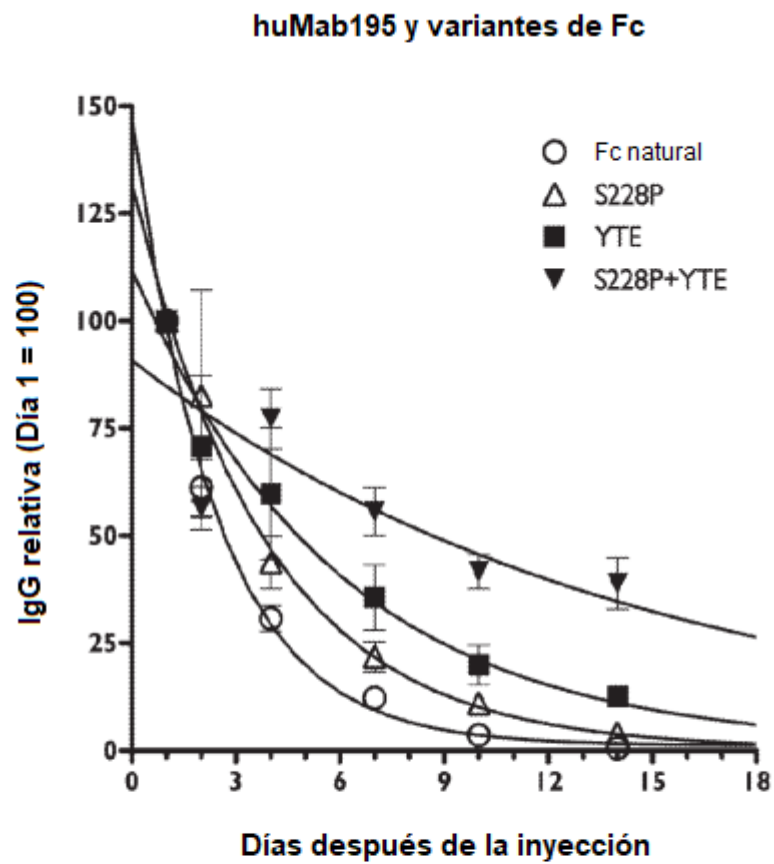
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYAASNQ
GSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKVEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID
NO:12)

FIGURA 6

Secuencia de la fusión de dominio extracelular CD33 humano - Fc

MDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDPVA
TNKLDQEVQEETQGRFRLLGDP SRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSP
QLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTC SVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPR
TTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVVPQNPTTGIFPGDGS
GKQETRAGVVAGHHHHHHHLVPRGSTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE
ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:13)

FIGURA 7



	Fc natural	S228P	YTE	S228+YTE
t1/2 (Día)	1,6	2,0	3,4	14,1

FIGURA 8

Secuencia de la parte de bisagra-Fc de la cadena pesada de la IgG4 humana natural

CPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID
NO:15)

Secuencia de la parte de bisagra-Fc de la cadena pesada de la IgG4 humana con mutaciones S228P e YTE que carece de la lisina en C-terminal

(en negrita y subrayado: restos de aminoácidos sustituidos)

CP**P**CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTL**Y****ITR**PEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (SEQ ID
NO:14)

FIGURA 9