

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 677**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/42** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 13185738 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2703415**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por IgE**

30 Prioridad:

**17.09.2008 US 97819 P**

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

**17.10.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 727 677 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por IgE

### Campo técnico

5 La presente descripción se refiere a composiciones de inmunoglobulina que se unen a IgE y FcγRIIb con alta afinidad, siendo dichas composiciones capaces de inhibir células que expresan IgE anclada a la membrana. Dichas composiciones son útiles para el tratamiento de trastornos mediados por IgE, incluyendo alergias y asma.

### Antecedentes de la invención

10 Las enfermedades y afecciones alérgicas, como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica y la alergia alimentaria, se han vuelto cada vez más frecuentes en las últimas décadas y ahora afectan al 10-40% de la población en los países industrializados. Las enfermedades alérgicas afectan profundamente la calidad de vida y pueden dar lugar a complicaciones graves, incluida la muerte, como puede ocurrir en casos graves de asma y anafilaxia. Las alergias son frecuentes y son la mayor causa de tiempo perdido en el trabajo y la escuela y su impacto en la vida personal, así como sus costes directos e indirectos para los sistemas médicos y la economía son enormes. Por ejemplo, la rinitis alérgica (fiebre del heno) afecta al 22% o más de la población de los Estados Unidos, mientras que se cree que el asma alérgica afecta a al menos 20 millones de residentes de los Estados Unidos. El impacto económico de las enfermedades alérgicas en los Estados Unidos, incluidos los costes de atención médica y la pérdida de productividad, se estimó en 6,4 billones de \$ solo en los primeros años de la década de los noventa.

20 La mayoría de las enfermedades alérgicas son causadas por reacciones de hipersensibilidad mediadas por inmunoglobulina E (IgE). La IgE es una clase de anticuerpo normalmente presente en el suero en concentraciones mínimas. Es producido por células plasmáticas secretoras de IgE que expresan el anticuerpo en su superficie en una cierta etapa de su maduración. Los pacientes alérgicos producen niveles elevados de IgE con especificidad de unión para antígenos generalmente inocuos a los que son sensibles. Estas moléculas de IgE circulan en la sangre y se unen a receptores específicos de IgE en la superficie de los basófilos en la circulación y en los mastocitos a lo largo de los revestimientos mucosos y debajo de la piel. La unión del antígeno o alérgeno a IgE en mastocitos, basófilos y otros tipos de células, retícula las moléculas de IgE y agrega los receptores subyacentes, lo que provoca que las células liberen mediadores estimuladores neuronales y vasoactivos, tal como histaminas, leucotrienos, prostaglandinas, bradichina y factor activador de plaquetas. La rápida reacción del sistema inmunitario al antígeno causado por los complejos inmunes de anticuerpos ha conducido al término reacción de hipersensibilidad inmediata o mediada por anticuerpos, en contraste con las reacciones de hipersensibilidad retardadas o mediadas por células que están mediadas por las células T. Las reacciones inmunitarias mediadas por IgE se denominan específicamente reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

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

40 Dado que la IgE juega un papel central en la mediación de la mayoría de las reacciones alérgicas, el diseño de tratamientos para controlar los niveles de IgE en el cuerpo y la regulación de la síntesis de IgE han sido de gran interés. Se han propuesto varias estrategias para tratar las enfermedades alérgicas mediadas por IgE al disminuir los niveles de IgE. Una estrategia consiste en neutralizar las moléculas de IgE uniendo la cadena ε de IgE en o cerca del sitio de unión del receptor Fc. Por ejemplo, Omalizumab (Xolair) es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado anti-IgE que se une a IgE en el mismo sitio Fc que FcεRI. Omalizumab causa una reducción en el suero total o IgE circulante en pacientes atópicos, lo que atenúa la cantidad de IgE específica de antígeno que puede unirse y sensibilizar a los mastocitos y basófilos tisulares. Esto, a su vez, conduce a una disminución de los síntomas de las enfermedades alérgicas. Curiosamente, los niveles séricos de IgE aumentan después del inicio de la terapia debido a la formación del complejo omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de interrumpir la terapia. En consecuencia, este problema puede llevar a falsos negativos en las pruebas de diagnóstico y, por lo tanto, los niveles de IgE deben verificarse de forma rutinaria. Por consiguiente, existe la necesidad de métodos y composiciones mejorados para reducir las enfermedades mediadas por IgE y los síntomas de la enfermedad.

55 Wigginton et al, Clin Exp Allergy. 2008 Feb;38(2):313-9. Epub 2007 Dic 7, describe una inmunoglobulina E reactiva con inmunoglobulina humana G1 anti-idiotipo que inhibe la desgranulación de basófilos mediante la reticulación de FcεpsilonRI con FcγgammaRIIb.

### Compendio de realizaciones ilustrativas

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo para su uso en el tratamiento de un trastorno mediado por IgE,

en donde dicho anticuerpo comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a IgE anclada a membrana y dicha región Fc es una variante de una la región Fc de IgG humana original que comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, S239D/S267E y S239D/I332E, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU de Kabat.

5 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende:

un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de la invención; y

un segundo ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona una célula huésped que comprende el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico de la invención.

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

La presente descripción proporciona nuevas moléculas de co-acoplamiento que se unen a IgE y FcγRIIb con alta afinidad, composiciones que comprenden dichas moléculas de co-acoplamiento y métodos para usar dichas nuevas moléculas de co-acoplamiento para tratar los trastornos mediados por IgE. Las moléculas de co-acoplamiento descritas son capaces de inhibir las células que expresan las membranas IgE y Fc y RIIb, es decir, las células IgE+ Fc y RIIb+. Las moléculas de co-acoplamiento descritas también son preferiblemente capaces de unirse a IgE circulante. Los métodos inhibidores descritos en este documento comprenden poner en contacto células IgE+ Fc y RIIb+ con una molécula de co-acoplamiento que co-acopla IgE y Fc y RIIb en la superficie de la célula.

Las composiciones descritas en el presente documento incluyen moléculas de co-acoplamiento capaces del co-acoplamiento de IgE y Fc y RIIb con alta afinidad en la superficie de la célula. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y Fc y RIIb con alta afinidad. Las moléculas de co-acoplamiento descritas preferiblemente IgE y FcγRIIb ancladas a la membrana de co-acoplamiento en la superficie de una célula y preferiblemente se unen a Fc y RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una inmunoglobulina y, de acuerdo con la invención, la inmunoglobulina es un anticuerpo, en donde la región Fv de dicho anticuerpo se une específicamente a IgE. Adecuadamente, dicho anticuerpo de acuerdo con la invención se une a IgE anclada a membrana. Dicho anticuerpo de acuerdo con la invención se une selectivamente a la IgE anclada a la membrana en relación con la IgE circulante. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo biespecífico que tiene una primera región específica diana y una segunda región específica diana, en donde la primera región específica diana se une a IgE y la segunda región específica diana se une a Fc y RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, las regiones específicas primera y segunda diana son regiones Fv, en donde la primera región Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a Fc y RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, molécula de co-acoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une Fc y RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En este caso, la pareja de fusión Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

35 Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento se une con Fc y RIIb, en donde la afinidad de dicha unión tiene una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, por ejemplo, inferior o igual a aproximadamente 95 nM, inferior o igual a aproximadamente 90 nM, inferior o igual a aproximadamente 85 nM, inferior o igual a aproximadamente 80 nM, inferior o igual a aproximadamente 75 nM, inferior o igual a aproximadamente 74 nM.

Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento que co-acopla IgE y Fc y RIIb con alta afinidad incluye una variante de inmunoglobulina con respecto a una inmunoglobulina original. Adecuadamente, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (por ejemplo, dos o más) modificación(es) en comparación con una región Fc parental, en donde dicha(s) modificación(es) se encuentran en las posiciones seleccionadas grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice de EU. Adecuadamente, la(s) modificación(es) se encuentran en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice EU. Adecuadamente, la(s) modificación(es) están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 266, 267, 268, 328, según el índice de EU. Adecuadamente, la(s) modificación(es) están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, según el índice de EU. Adecuadamente, la(s) modificación(es) están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice de EU.

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

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

Adecuadamente, dicha(s) modificación(es) dan como resultado al menos una de las siguientes combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 239D/332E, 267E/268D, 267E/268E, y 267E/328F, en donde la numeración es un índice EU.

Adecuadamente, las modificaciones descritas en este documento reducen la afinidad a al menos un receptor con respecto a la inmunoglobulina original, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RIIa y Fc  $\gamma$  RIIIa. En este caso, las variantes de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden mediar ADCC o ADCP reducidos en relación con la inmunoglobulina parental. Adecuadamente, las modificaciones descritas en el presente documento aumentan la afinidad con al menos un receptor con respecto a la inmunoglobulina parental, en donde dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en Fc  $\gamma$  RI, Fc  $\gamma$  RIIa y Fc  $\gamma$  RIIIa. En este caso, las variantes de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden mediar un aumento de ADCC o ADCP en relación con la inmunoglobulina parental.

En el presente documento también se describen métodos para diseñar las nuevas moléculas de co-acoplamiento, que incluyen composiciones de inmunoglobulina.

En el presente documento también se describen ácidos nucleicos aislados que codifican las moléculas de co-acoplamiento, que incluyen las inmunoglobulinas descritas en el presente documento. En el presente documento también se describen vectores que comprenden los ácidos nucleicos, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. En el presente documento también se describen células huésped que contienen los vectores, y métodos para producir y opcionalmente recuperar las moléculas de co-acoplamiento.

En el presente documento también se describen moléculas de co-acoplamiento que comprenden las inmunoglobulinas descritas en el presente documento. Las moléculas de co-acoplamiento pueden encontrar uso en un producto terapéutico. Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden ser anticuerpos.

También se describen composiciones que comprenden moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento, y un vehículo o diluyente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable.

En el presente documento también se describen métodos para inhibir las células IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup>. Los métodos de inhibición de las células descritos en el presente documento comprenden poner en contacto una célula IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup> con una molécula de co-acoplamiento, en donde dicha molécula de co-acoplamiento se une a Fc $\gamma$ RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, dicha molécula de co-acoplamiento co-acopla IgE y Fc  $\gamma$  RIIb en la superficie de la célula. Adecuadamente, los métodos de inhibición comprenden poner en contacto una célula IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup> con un anticuerpo, en donde dicho anticuerpo se une a IgE a través de su región Fv, y en donde dicho anticuerpo comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a Fc $\gamma$ RIIb con Kd de 100 nM o menos. Adecuadamente, dicha región Fc se une a Fc $\gamma$ RIIa y/o Fc $\gamma$ RIIIa con una afinidad que es mayor en relación con la IgG1 nativa. Adecuadamente, los métodos comprenden poner en contacto células IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup> con una molécula de co-acoplamiento, en donde dicha molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une a IgE y dicha segunda región Fv se une a Fc $\gamma$ RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Los métodos comprenden poner en contacto las células IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup> con una molécula de co-acoplamiento, en donde dicha molécula de co-acoplamiento es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a Fc $\gamma$ RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

La memoria descriptiva también describe un método para reducir la secreción de IgE. El método incluye poner en contacto una célula IgE<sup>+</sup> Fc  $\gamma$  RIIb<sup>+</sup> con una molécula de co-acoplamiento, en donde dicha molécula de unión se une a IgE y Fc $\gamma$ RIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.

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

5 También se describen usos terapéuticos y de diagnóstico para las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento. Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento se usan para tratar uno o más trastornos mediados por IgE, por ejemplo, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc., que están mediadas por inmunoglobulina IgE. Adecuadamente, los trastornos alérgicos y atópicos que pueden tratarse con las composiciones descritas en el presente documento incluyen, entre otros, asma alérgica y atópico, dermatitis y eccema atópicos, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinocomunitivitis, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, shock anafiláctico y alergias a cualquier variedad de alergias ambientales o alimentarias. Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento comprenden la administración a un paciente que necesita dicha administración de una cantidad terapéutica de una molécula de co-acoplamiento que co-  
10 acopla IgE y FcγRIIb en la superficie de una célula.

### Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1. Ilustración del nuevo enfoque mecánico para inhibir las células B IgE+ FcγRIIb+. Bajo estímulos apropiados, las células B primitivas pueden diferenciarse en células B IgE+. El acoplamiento del antígeno con el receptor de la célula B de IgE activa estas células, que después pueden diferenciarse en células plasmáticas que liberan IgE circulante. La unión de las IgE circulantes se une a los FcεR, por ejemplo, en los mastocitos, basófilos y eosinófilos, activa estas células. La liberación de histamina, prostaglandinas y otros mediadores químicos en última instancia  
20 resulta en los síntomas clínicos de alergia y asma. Omalizumab, que tiene una región Fc de IgG1 nativa, es capaz de bloquear la unión de IgE a FcεR. Los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb, denominados Anti-IgE-IIbE en la figura, son capaces de no solo bloquear la unión de IgE a FcεR, sino también de inhibir la activación de las células IgE + B mediante el co-acoplamiento de mIgE FcγRIIb.

25 Figura 2. Sensogramas de resonancia de plasmón de superficie biacore que muestran la unión de los anticuerpos anti-CD19 de la variante de Fc al FcγRIIb humano.

Figura 3. Afinidades de los anticuerpos de la variante Fc para los FcγR humanos según lo determinado por Biacore. El gráfico muestra el log (K<sub>A</sub>) para la unión de la variante y los anticuerpos WT IgG1 a FcγRI (I) humano, H131 FcγRIIA (HIIA), FcγRIIb (IIB) y V158 FcγRIIIA (VIIIA). La unión de G236D/S267E y S267E/L328F a V158 FcγRIIIA no fue detectable. La unión de G236R/L328R (Fc-KO) a todos los receptores probados no fue detectable.

30 Figura 4. Afinidades de los anticuerpos de la variante de Fc para FcγR humanos según lo determinado por la resonancia de plasmón de superficie Biacore. La tabla proporciona el equilibrio K<sub>D</sub> para la unión de anticuerpos variantes y WT IgG1 a FcγRI humano, H131 FcγRIIA FcγRIIb, y V158 FcγRIIIA, y la unión plegada de cada uno con relación a IgG1 nativo (WT). n.d. = no detectable.

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

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

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

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

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

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

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

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

Figura 13. Los anticuerpos anti-IgE variantes no inhiben las células B de IgG2+ con cambio de clase. El gráfico muestra la concentración de IgG2 liberada a partir de PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, α-CD40, y

concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

Figura 14. Inhibición de las células B de IgE<sup>+</sup> con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE potenciados para la afinidad por FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40) y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 15. Inhibición de las células B de IgE<sup>+</sup> con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE potenciados para la afinidad por FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de reticulación de BCR anti-CD79b y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 16. Inhibición de las células B de IgE<sup>+</sup> con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE mejorada para la afinidad por FcγRIIb. El gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de reticulación anti-μ BCR y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

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

Figura 18. La inhibición de las células B de IgE<sup>+</sup> con cambio de clase con variantes de anticuerpos anti-IgE mejoró la función de los efectos de ADCC y ADCP. el gráfico muestra la concentración de IgE liberada de las PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de reticulación anti-μ BCR y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

Figura 19. Protocolo para el estudio in vivo de huPBL-SCID para probar la actividad de los anticuerpos anti-IgE. Los días indicados reflejan el número de días después del injerto de PBMC de un donante que realizó pruebas para anticuerpos IgE específicos para Der p 1. Vacuna derp1. Indica vacunación con antígeno der p 1.

Figura 20. Niveles séricos totales de IgG del modelo in vivo de huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23 y 37) reflejan las extracciones de sangre indicadas en el protocolo de la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab\_IgG1, y los grupos 3 H1L1 MaE11 indican grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una variante WT IgG1 (IgG1), S267E/L328F (IIbE), o G236R/L328R (Fc-KO) de la región Fc.

Figura 21. Niveles de suero totales de IgE del modelo in vivo de huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23 y 37) reflejan las extracciones de sangre indicadas en el protocolo de la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab\_IgG1, y los grupos 3 H1L1 MaE11 indican grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una variante WT IgG1 (IgG1), S267E/L328F (IIbE), o G236R/L328R (Fc-KO) de la región Fc. El límite de cuantificación para el método ELISA fue de 31,6 ng/mL; Las muestras que estaban por debajo de este límite se informaron como 31,6 ng/mL en el gráfico.

#### Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

En este documento se describen las moléculas de co-acoplamiento que imitan los efectos inhibidores de el co-acoplamiento de la IgE anclada en la membrana con FcγRIIb en las células B. Por ejemplo, en el presente documento se describen variantes de anticuerpos anti-IgE diseñados de manera tal que el dominio Fc se une a FcγRIIb con una afinidad de hasta 430 veces mayor. En relación con la IgG1 nativa, las variantes potenciadas en la unión a FcγRIIb (IIbE) inhiben fuertemente la movilización de calcio inducida por BCR y la viabilidad en las células B primarias de IgE<sup>+</sup> humanas. El uso de una sola molécula, como un anticuerpo para suprimir las funciones de las células B mediante la coacción de IgE BCR y FcγRIIb afines puede representar un nuevo enfoque en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE. Los ejemplos no limitativos de enfermedades mediadas por IgE incluyen respuestas alérgicas y asma y se describen con más detalle a continuación.

Las moléculas de co-acoplamiento según la descripción pueden tomar una variedad de configuraciones como se indica con más detalle a continuación. Adecuadamente, la molécula de acoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y FcγRIIb con alta afinidad. En este caso, la inmunoglobulina se co-acopla preferiblemente a la membrana anclada a IgE y FcγRIIb en la superficie de una célula y se une con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una molécula biespecífica que tiene una primera región específica diana y una segunda región específica diana, en donde la primera región específica diana se une a IgE y la segunda región específica diana se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM, aunque adecuadamente puede unirse a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 10 nM o una Kd inferior a aproximadamente 1 nM y, en algunos casos, puede unirse a una Kd inferior a 100 pM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo biespecífico y la primera y segunda regiones específicas diana son regiones Fv, en donde la primera región

Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd de inferior a aproximadamente 100 nM. En este caso, la pareja de fusión Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

5 Aquí se describen varias definiciones. Dichas definiciones están destinadas a abarcar los equivalentes gramaticales.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos", como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

10 Por "ADCP" o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos, como se usa en el presente documento, se entiende la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.

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

25 Por "anticuerpo" en el presente documento se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por la totalidad o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en humanos, incluyen los loci genéticos de la cadena pesada kappa (κ), lambda (λ), que juntos forman la miríada de genes de región variable y los genes de la región constante mu (ν), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ) y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. El anticuerpo en este documento pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un anticuerpo generado de forma recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros.

30 Por "aminoácido" e "identidad de aminoácido", como se usa en este documento, se entiende uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier análogo no natural que pueda estar presente en una posición específica definida.

Por "célula CD32b+" o "célula FcγRIIb", como se usa en el presente documento, se entiende cualquier célula o tipo celular que exprese CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b+ incluyen, entre otras, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos.

35 Por "célula IgE+", como se usa en el presente documento, se entiende cualquier célula o tipo celular que exprese IgE. Adecuadamente, las células IgE+ expresan IgE anclada a la membrana (mIgE). Las células IgE+ incluyen, entre otras, células B y células plasmáticas.

40 Por "CDC" o "citotoxicidad dependiente del complemento", como se usa en el presente documento, se entiende la reacción en la que uno o más componentes de la proteína del complemento reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

Por "molécula de acoplamiento" o equivalentes gramaticales se entiende una molécula bifuncional capaz de unirse tanto a IgE como a FcγRIIb, en donde la Kd para la unión de la molécula a FcγRIIb es inferior a aproximadamente 100 nM en una superficie celular, lo que da como resultado la unión simultánea de IgE y FcγRIIb.

45 Por "región constante" de un anticuerpo como se define en este documento se entiende la región del anticuerpo que está codificada por uno de los genes de la región constante de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada. Por "cadena ligera constante" o "región constante de cadena ligera", como se usa aquí, se entiende la región de un anticuerpo codificado por las cadenas ligeras kappa (Cκ) o lambda (Cλ). La cadena ligera constante comprende típicamente un solo dominio, y como se define aquí se refiere a las posiciones 108-214 de Cκ o Cλ, en donde la numeración es según el índice de EU. Por "cadena pesada constante" o "región constante de cadena pesada", como se usa en este documento, se entiende la región de un anticuerpo codificado por los genes mu, delta, gamma, alfa o épsilon para definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, o IgE, respectivamente. Para los anticuerpos IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, como se define aquí, se refiere N terminal del dominio CH1 al C terminal del dominio CH3, que comprende las posiciones 118-447, en donde la numeración es según el índice EU.

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

- 5 Por "célula efectora", como se usa en este documento, se entiende una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores Fc y/o complementarios y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T  $\gamma\delta$ , y pueden ser de cualquier organismo que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.
- Por "Fab" o "región Fab", como se usa aquí, se entiende los polipéptidos que comprenden la  $V_H$ , CH1,  $V_H$  y dominios de inmunoglobulina  $C_L$ . Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o fragmento de anticuerpo.
- 10 Por "Fc" o "región Fc", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra N-terminal flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre C $\gamma$ 1 (Cy1) y C $\gamma$ 2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define generalmente para comprender los residuos C226 o P230 a su carboxilo terminal, en donde la numeración es según el índice de EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región aislada o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación.
- 15 Por "polipéptido Fc", como se usa en este documento, se entiende un polipéptido que comprende la totalidad o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fcs aislados y fragmentos Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser polipéptidos Fc.
- 20 Por "fusión Fc", como se usa en este documento, se entiende una proteína en donde uno o más polipéptidos están unidos operativamente a Fc. La fusión de Fc se entiende aquí como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig" y "globulina receptora" (a veces con guiones) como se usa en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200). Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con una pareja de fusión, que en general puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de una fusión Fc, es decir, la pareja de fusión, es mediar la unión a la diana, y por lo tanto es funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo. Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede estar vinculada a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión Fc a un objetivo terapéutico. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, por ejemplo, un receptor extracelular que esté implicado en la enfermedad.
- 25 Por "receptor gamma Fc" o "Fc $\gamma$ R", como se usa en este documento, se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y están sustancialmente codificados por los genes Fc $\gamma$ R. En los seres humanos, esta familia incluye, pero no se limita a, Fc $\gamma$ RI (CD64), incluidas las isoformas Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIb y Fc $\gamma$ RIc; Fc $\gamma$ RII (CD32), incluidas las isoformas Fc $\gamma$ RIIa (incluidos los alotipos H131 y R131), Fc $\gamma$ RIIb (incluidos Fc $\gamma$ RIIb-1 y Fc $\gamma$ RIIb-2) y Fc $\gamma$ RIIc; y Fc $\gamma$ RIII (CD16), incluidas las isoformas Fc $\gamma$ RIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158) y Fc $\gamma$ RIIIb (incluidos los alotipos Fc $\gamma$ RIIIb-NA1 y Fc $\gamma$ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82: 57-65), así como cualquier isoforma o alotipo Fc $\gamma$ Rs o Fc $\gamma$ R humanos no descubiertos. Un Fc $\gamma$ R puede ser de cualquier organismo, incluidos, entre otros, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los Fc $\gamma$ Rs de ratón incluyen, pero no se limitan a, Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16) y Fc $\gamma$ RIII-2 (CD16-2), así como cualquier isoforma de Fc $\gamma$ Rs o Fc $\gamma$ R de ratón no descubiertos.
- 30 Por "ligando de Fc" o "receptor de Fc", como se usa en este documento, se entiende una molécula, por ejemplo, un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de ligando Fc. Los ligandos de Fc incluyen, entre otros, Fc $\gamma$ Rs, Fc $\gamma$ Rs, Fc $\gamma$ Rs, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A *estafilocócica*, proteína G *estreptocócica* y Fc $\gamma$ R viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor de Fc (FcRH), que son una familia de receptores de Fc que son homólogos a los Fc $\gamma$ R (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190: 123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.
- 35 Por "anticuerpo de longitud completa", como se usa en el presente documento, se entiende la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluidas las regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada uno de los cuales tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada una de las cuales comprende cadenas de luz que comprenden dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3. En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, cada una de las cuales contiene un dominio variable unido a la región Fc.
- 55

- 5 Por "inmunoglobulina" en el presente documento se entiende una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (incluidos anticuerpos biespecíficos) y fusiones Fc. Las inmunoglobulinas pueden tener varias formas estructurales, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales.
- Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" como se usa en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta según lo determinado por un experto en la técnica de la estructura de proteínas. Los dominios de Ig suelen tener una topología de plegamiento  $\beta$ -sandwich característica. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo de anticuerpos IgG son VH Cy1, Cy2, Cy3, VL y CL.
- 10 Por "IgG" o "inmunoglobulina IgG" o "inmunoglobulina G", como se usa en este documento, se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma de inmunoglobulina reconocido. En seres humanos, esta clase comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- Por "IgE" o "inmunoglobulina IgE" o "inmunoglobulina E" como se usa en este documento, se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen reconocido de inmunoglobulina épsilon. La IgE puede estar anclada a la membrana (mIgE), o no anclada a la membrana, también denominada en la presente memoria como IgE circulante.
- 15 Por "inhibición" de células o equivalentes gramaticales se entiende prevenir o reducir la activación, proliferación, maduración o diferenciación de células diana.
- Por "isotipo", como se usa en este documento, se entiende cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE.
- 20 Por "modificación" en el presente documento se entiende una alteración en las propiedades físicas, químicas o de secuencia de una proteína, polipéptido, anticuerpo o inmunoglobulina. Las modificaciones descritas en este documento incluyen modificaciones de aminoácidos y modificaciones de glicofomas.
- 25 Por "modificación de glicofoma" o "glicofoma modificada" o "glicofoma modificada por ingeniería genética" como se usa en este documento, se entiende una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una proteína original. La glicofoma modificada se refiere típicamente a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; así, por ejemplo, una variante de Fc puede comprender una glicofoma modificada. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la variante de Fc que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos.
- 30 Por "polipéptido parental", "proteína parental", "inmunoglobulina parental", "polipéptido precursor", "proteína precursora" o "inmunoglobulina precursora" como se usa en este documento se entiende un polipéptido, proteína o inmunoglobulina no modificada que se modifica posteriormente para generar una variante, por ejemplo, cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que sirve como plantilla y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en el presente documento. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o versión de ingeniería de un polipéptido de origen natural. El polipéptido principal puede referirse al propio polipéptido, a las composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En consecuencia, por "polipéptido Fc parental" como se usa en este documento se entiende un polipéptido Fc que se modifica para generar un polipéptido Fc variante, y por "anticuerpo parental" como se usa en este documento se entiende un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante (por ejemplo, un anticuerpo parental puede incluir, pero no se limita a, una proteína que comprende la región constante de una Ig de origen natural).
- 35 Por "posición" como se usa en este documento se entiende una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo, el índice EU como se describe en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo humano IgG1.
- 40 Por "polipéptido" o "proteína", como se usa en el presente documento, se entiende al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.
- Por "residuo" como se usa en este documento se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la Asparagina 297 (también denominada Asn297, también denominada N297) es un residuo en el anticuerpo humano IgG1.
- 45 Por "antígeno diana", como se usa en el presente documento, se entiende la molécula que está unida por la región variable de un anticuerpo dado, o la pareja de fusión de una fusión Fc. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. Se dice que una fusión de anticuerpo o Fc es "específica" para un antígeno diana dado en base a tener afinidad por el antígeno diana.
- 50 Por "célula diana", como se usa en este documento, se entiende una célula que expresa un antígeno diana.

Por "región variable", como se usa en el presente documento, se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes  $V_k$ ,  $V_\lambda$  y/o  $V_H$  que conforman los loci genéticos de inmunoglobulina kappa, lambda y la cadena pesada, respectivamente.

- 5 Por "polipéptido variante", "variante polipeptídica", o "variante" como se usa en este documento, se entiende una secuencia polipeptídica que difiere de la de una secuencia polipeptídica original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido original puede ser un polipéptido natural o de tipo salvaje (WT), o puede ser una versión modificada de un polipéptido WT. El polipéptido variante puede referirse al propio polipéptido, a una composición que comprende el polipéptido, o a la secuencia amino que lo codifica. Adecuadamente, los polipéptidos variantes descritos en este documento (por ejemplo, inmunoglobulinas variantes) pueden tener al menos una modificación de aminoácidos en comparación con el polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., en comparación con el parental. La secuencia polipeptídica variante en este documento puede poseer al menos aproximadamente 80% de homología con una secuencia polipeptídica parental, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% de homología, 95% de homología, etc. Por consiguiente, por "variante de Fc" o "variante Fc" como se usa en este documento significa una secuencia Fc que difiere de la secuencia Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Una variante de Fc puede abarcar solo una región Fc, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión de Fc, Fc aislado, fragmento de Fc u otro polipéptido que esté sustancialmente codificado por Fc. La variante de Fc puede referirse al propio polipéptido de Fc, a las composiciones que comprenden el polipéptido de la variante de Fc, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por "variante de polipéptido Fc" o "polipéptido Fc variante", como se usa en este documento, se entiende un polipéptido Fc que difiere de un polipéptido Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de proteína" o "proteína variante", como se usa en el presente documento, se entiende una proteína que difiere de una proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo de variante", como se usa en el presente documento, se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de IgG" o "IgG variante", como se usa en este documento, se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", como se usa en el presente documento, se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina original en virtud de al menos una modificación de aminoácido.
- 30 Por "tipo salvaje" o "WT" en el presente documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluidas las variaciones alélicas. Una proteína WT, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionalmente.

#### Moléculas de co-acoplamiento

- 35 Como se describe en este documento, las moléculas de co-acoplamiento son moléculas bifuncionales capaces de unirse a Fc $\gamma$ R1Ib e IgE en la superficie de una célula. Estas moléculas pueden tomar una variedad de configuraciones como se describe con más detalle en este documento. Preferiblemente, las moléculas de co-acoplamiento son proteicas, aunque esto no es necesariamente imprescindible. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento puede ser una molécula bifuncional en la que la especificidad para Fc $\gamma$ R1Ib y/o IgE se confiere por una molécula pequeña, ácido nucleico y/o polipéptido, por ejemplo. Preferiblemente, la molécula de co-acoplamiento se une a Fc $\gamma$ R1Ib con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y Fc $\gamma$ R1Ib con alta afinidad. En este caso, la inmunoglobulina co-acopla preferiblemente IgE anclada a la membrana y Fc $\gamma$ R1Ib en la superficie de una célula. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una molécula biespecífica que tiene una primera región específica diana y una segunda región específica diana, en la que la primera región específica diana se une a IgE y la segunda región específica diana se une a Fc $\gamma$ R1Ib con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo biespecífico y la primera y segunda regiones específicas diana son regiones Fv, en donde la primera región Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a Fc $\gamma$ R1Ib con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una fusión Fc que comprende una región Fc, en la que dicha región Fc se une a Fc $\gamma$ R1Ib con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. En este caso, la pareja de fusión Fc de la inmunoglobulina se une a la IgE.

- Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento es una molécula bifuncional en la que una primera región se une a IgE y una segunda región se une a Fc $\gamma$ R1Ib con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Prácticamente cualquier proteína, molécula pequeña o ácido nucleico, por ejemplo, aptámeros, puede unirse para generar la molécula de unión bifuncional y puede incluir enlazadores como se describe en este documento. Las parejas de fusión de proteínas adecuadas pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de un anticuerpo, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimiocina o alguna otra proteína o dominio de la proteína. Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente que dirija la molécula de co-acoplamiento a un antígeno diana, como la IgE. Adecuadamente, la molécula de co-acoplamiento puede comprender Fc $\epsilon$ RI o Fc $\epsilon$ R2/CD23 como un compañero de fusión. Adecuadamente, las inmunoglobulinas encuentran uso como moléculas de co-acoplamiento.

## Inmunoglobulinas

Como se describe en el presente documento, una inmunoglobulina es un componente preferido de una molécula de co-acoplamiento y puede ser un anticuerpo, una fusión Fc, un Fc aislado, un fragmento Fc o un polipéptido Fc. De acuerdo con la invención, una inmunoglobulina es un anticuerpo. Como se describe con más detalle a continuación, la inmunoglobulina encuentra uso como una molécula bifuncional en la que la región Fv se une a IgE y la región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM. Además, un anticuerpo encuentra uso en fusiones Fc o anticuerpos bifuncionales como se describe a continuación.

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas emparejadas. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos, y son responsables de unirse al antígeno diana. Cada cadena está formada por dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales y, por lo tanto, el término genérico inmunoglobulina se usa para dichas proteínas.

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada uno tiene un "peso ligero" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. IgA tiene varias subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgA1 e IgA2. Por lo tanto, "isotipo" como se usa en este documento se refiere a cualquiera de las clases y subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

Cada una de las cadenas ligeras y pesadas está formada por dos regiones distintas, denominadas regiones variable y constante. La cadena pesada de IgG está compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al extremo C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, en referencia al dominio variable de la cadena pesada, el dominio constante de la cadena pesada 1, el dominio constante de la cadena pesada 2, y dominio constante 3 de la cadena pesada, respectivamente (también conocido como VH-C<sub>γ</sub>1-C<sub>γ</sub>2-C<sub>γ</sub>3, que se refiere al dominio variable de la cadena pesada, el dominio gamma 1 constante, el dominio gamma 2 constante y el dominio gamma 3 constante, respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al terminal C en el orden VLCL, en referencia al dominio variable de la cadena ligera y al dominio constante de la cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencias y son responsables de unir varias proteínas naturales para provocar eventos bioquímicos importantes. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias más sutiles en la región variable.

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula y, por lo tanto, determina la especificidad de un anticuerpo para su antígeno diana. La región variable se llama así porque es la secuencia más distinta de otros anticuerpos dentro de la misma clase. La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento de antígenos. En la región variable, se agrupan tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se conoce como una región determinante de la complementariedad (en lo sucesivo, "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es más significativa. Hay un total de 6 CDR, tres por cada cadena pesada y ligera, designadas como VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3. La región variable fuera de las CDR se conoce como la región de marco (FR). Aunque no es tan diversa como las CDR, la variabilidad de la secuencia ocurre en la región FR entre diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de anticuerpos proporciona una estructura estable (la región FR) sobre la cual el sistema inmunitario puede explorar una diversidad sustancial de unión a antígenos (las CDR) para obtener especificidad para una amplia gama de antígenos. Se dispone de una serie de estructuras de alta resolución para una variedad de fragmentos de región variable de diferentes organismos, algunos no unidos y otros en complejo con antígeno. La secuencia y las características estructurales de las regiones variables de anticuerpos se describen, por ejemplo, en Morea et al., 1997, *Biophys Chem* 68: 9-16; Morea et al., 2000, *Methods* 20: 267-279, y las características conservadas de los anticuerpos se describen, por ejemplo, en Maynard et al., 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-376.

La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante que es la principal responsable de la función efectora. En la subclase de inmunoglobulinas IgG, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinta. De interés en las realizaciones descritas en el presente documento son los dominios de la cadena pesada, que incluyen los dominios pesado constante (CH) y la región bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos IgG tienen cada uno tres regiones CH. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 según el índiceUE como en Kabat. "CH2" se

refiere a las posiciones 237-340 según el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice UE como en Kabat.

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

De interés en las realizaciones descritas en este documento son las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc", como se usa en el presente documento, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo que excluye el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra N-terminal flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la región bisagra inferior entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define generalmente para incluir los residuos C226 o P230 a su carboxilo terminal, en donde la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región aislada o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación. Por "polipéptido Fc", como se usa en este documento, se entiende un polipéptido que comprende la totalidad o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fc aislados y fragmentos Fc.

La región Fc de un anticuerpo interactúa con varios receptores y ligandos Fc, impartiendo una serie de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Para la región Fc de IgG, Fc comprende los dominios Cy2 y Cy3 de Ig y la bisagra N-terminal que conduce a Cy2. Una familia importante de receptores Fc para la clase IgG son los receptores gamma Fc (FcγRs). Estos receptores median la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunológico (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). En seres humanos, esta familia de proteínas incluye FcγRI (CD64), incluidas las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluidas las isoformas FcγRIIa (incluidos los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluidos FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluidas las isoformas FcγRIIIa (incluidos los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluidos los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). Estos receptores típicamente tienen un dominio extracelular que media la unión a Fc, una región que abarca la membrana y un dominio intracelular que puede mediar algún evento de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T γγ. La formación del complejo Fc/FcγR recluta estas células efectoras a sitios de antígenos unidos, lo que generalmente resulta en eventos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunes posteriores, como la liberación de mediadores de inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad de mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial mediante el cual los anticuerpos destruyen las células diana. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la lisis de la célula diana, se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, posteriormente, causan la fagocitosis de la célula diana, se denomina fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP).

Las diferentes subclases de IgG tienen afinidades diferentes para los FcγR, con IgG1 e IgG3 típicamente uniéndose sustancialmente mejor a los receptores que IgG2 e IgG4 (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). Los FcγR se unen a la región Fc de IgG con diferentes afinidades. Los dominios extracelulares de FcγRIIIa y FcγRIIIb son idénticos en un 96%, sin embargo, FcγRIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que FcγRI, FcγRIIa/c, y FcγRIIIa son reguladores positivos de la activación activada por el complejo inmune, caracterizada por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptor (ITAM), FcγRIIb tiene un motivo de inhibición basada en tirosina inmunoreceptor (ITIM) y por lo tanto es inhibitoria. Por lo tanto, los primeros se denominan receptores de activación, y FcγRIIb se denomina receptor inhibitorio. A pesar de estas diferencias en las afinidades y actividades, todos los FcγR se unen a la misma región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cy2 y la bisagra precedente. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann et al., 2001, *J Mol Biol* 309: 737-749), y se han resuelto varias estructuras del Fc humano unido al dominio extracelular del FcγRIIIb humano (código de acceso pdb 1E4K) (Sondermann et al., 2000, *Nature* 406: 267-273) (códigos de acceso pdb 1IIS y 1IIX) (Radaev et al., 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477).

Un sitio superpuesto pero separado en Fc sirve como interfaz para la proteína del complemento C1q. De la misma manera que la unión de Fc/FcγR media en la ADCC, la unión de Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente del

complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cy2 y Cy3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, cuya unión recicla el anticuerpo endocitosado del endosoma al torrente sanguíneo (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766). Este proceso, junto con la exclusión de la filtración del riñón debido al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado vidas medias en suero de anticuerpos favorables que varían de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también desempeña un papel clave en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión de FcRn en Fc también es el sitio en el que se unen las proteínas bacterianas A y G. La unión estrecha por estas proteínas se explota típicamente como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de proteína. La fidelidad de estas regiones, el complemento y las regiones de unión FcRn/proteína A son importantes tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos como para su desarrollo.

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

Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en el presente documento también pueden ser una proteína similar a un anticuerpo conocida como fusión Fc (Chamow et al., 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). "Fusión Fc" se entiende aquí como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión Ig", "quimera Ig" y "globulina receptora" (a veces con guiones) como se usa en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). Una fusión con Fc es una proteína en la que uno o más polipéptidos, aquí referidos como una "pareja de fusión", está unida operativamente a Fc. Una fusión Fc combina la región Fc de un anticuerpo y, por lo tanto, sus funciones efectoras y farmacocinéticas favorables, con la región de unión a la diana de un receptor, ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. El papel de este último es mediar en el reconocimiento del objetivo, y por lo tanto es funcionalmente análogo a la región variable del anticuerpo. Debido a la superposición estructural y funcional de las fusiones de Fc con anticuerpos, la discusión sobre los anticuerpos en la presente descripción se extiende también a las fusiones de Fc.

Prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña puede estar vinculada a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no se limitan a, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a la diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimocina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente que dirija la fusión Fc a un antígeno diana. Dicho antígeno diana puede ser cualquier molécula, por ejemplo, un receptor extracelular, que esté implicado en la enfermedad. Las fusiones Fc descritas en el presente documento tienen preferentemente especificidad por la IgE. Por ejemplo, en casos preferidos, las fusiones de Fc de la divulgación pueden comprender FcεRI o FcεRII/CD23 como una pareja de fusión. Las fusiones de Fc de la descripción comprenden preferiblemente una o más variantes en la región Fc que mejoran la afinidad por FcγRIIb.

Los socios de fusión pueden estar vinculados a cualquier región de una región Fc, incluso en los extremos N o C, o en algún residuo entre los extremos. Adecuadamente, una pareja de fusión está unida en el extremo N o C de la región Fc. Una variedad de enlazadores puede encontrar uso en algunos casos descritos en el presente documento para enlazar covalentemente las regiones Fc a una pareja de fusión. Por "enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de los mismos, en este documento se entiende una molécula o grupo de moléculas (como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y con frecuencia sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los enlazadores homo o heterofuncionales son bien conocidos (ver, 1994 Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200). Se pueden usar varias estrategias para unir covalentemente las moléculas entre sí. Estos incluyen, pero no se limitan a, enlaces polipeptídicos entre los extremos N y C de las proteínas o dominios de proteínas, enlaces a través de enlaces disulfuro y enlaces a través de reactivos de reticulación química. Adecuadamente, el enlazador es un enlace peptídico, generado por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes restos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud adecuada para unir dos moléculas de tal manera que asuman la conformación correcta entre sí para que conserven la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. Adecuadamente, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos. Adecuadamente, se pueden usar h enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (incluyendo, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEC ID NO: 1), (GGGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEC ID NO: 2), y GGGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEQ ID NO: 3), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como apreciarán los expertos en la técnica. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores, que puede ser útil para enlazar una región Fc a una pareja de fusión.

- También se contemplan como parejas de fusión los polipéptidos Fc. Por lo tanto, una inmunoglobulina como se describe en el presente documento puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende dos o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para los receptores Fc con una única molécula de proteína. Adecuadamente, las regiones Fc pueden unirse mediante un enfoque de ingeniería química. Por ejemplo, los Fab y los Fc pueden estar unidos por enlaces tioéter que se originan en los residuos de cisteína en las bisagras, generando moléculas como FabFc<sub>2</sub>. Las regiones Fc se pueden vincular mediante ingeniería de disulfuro y/o reticulación química. Adecuadamente, las regiones Fc pueden estar unidas genéticamente. Adecuadamente, las regiones Fc en una inmunoglobulina están unidas genéticamente a las regiones Fc unidas en tándem generadas como se describe en USSN 11/022,289 (US2005-0249723 A1), presentada el 21/12/2004, titulada "Fc polypeptides with novel Fc ligand binding sites.". Los polipéptidos Fc unidos en tándem pueden comprender dos o más regiones Fc, por ejemplo, de una a tres regiones Fc, dos regiones Fc. Puede ser ventajoso explorar una serie de construcciones de ingeniería con el fin de obtener regiones Fc unidas homo o heteronemadamente con las propiedades estructurales y funcionales más favorables. Las regiones Fc unidas en tándem pueden ser regiones Fc unidas de forma homóloga, es decir, una región Fc de un isotipo está fusionada genéticamente a otra región Fc del mismo isotipo. Se anticipa que debido a que existen múltiples sitios de unión a FcγR, C1q y/o FcRn en los polipéptidos Fc unidos en tándem, pueden mejorarse las funciones efectoras y/o la farmacocinética. Adecuadamente, las regiones Fc de diferentes isotipos pueden estar unidas en tándem, denominadas regiones Fc unidas heterotandemáticamente. Por ejemplo, debido a la capacidad de dirigirse a los receptores FcγR y FcαRI, una inmunoglobulina que se une tanto a FcγRs como a FcαRI puede proporcionar una mejora clínica significativa.
- Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en el presente documento pueden codificarse sustancialmente por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento encuentran uso en anticuerpos o fusiones Fc que comprenden secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. La Figura 1 proporciona una alineación de estas secuencias de IgG humanas. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento encuentran uso en anticuerpos o fusiones Fc que comprenden secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos IgA (incluidas las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG o IgM. Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden comprender más de una cadena proteica, por ejemplo, puede ser un anticuerpo o fusión Fc que es un monómero u oligómero, que incluye un homo- o hetero-oligómero.
- Las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden estar sustancialmente codificadas por genes de cualquier organismo, por ejemplo, mamíferos (que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, roedores (que incluyen, pero no se limitan a, ratones y ratas), lagomorfos que incluyen, pero no se limitan a, conejos y liebres), camélidos (que incluyen, pero no se limitan a, camellos, llamas y dromedarios) y primates no humanos, que incluyen, pero no se limitan a, Prosimios, Platyrrhini (monos del Nuevo Mundo), Cercopithecoidea (monos del Viejo Mundo) y Hominoidea incluyendo los Gibbons y los monos menores y grandes. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden ser sustancialmente humanas.
- Como es bien conocido en la técnica, existen polimorfismos de inmunoglobulina en la población humana. El polimorfismo de Gm está determinado por los genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que tienen alelos que codifican los determinantes antigénicos alotípicos denominados alotipos G1m, G2m y G3m para los marcadores de las moléculas humanas IgG1, IgG2 e IgG3 (no se han encontrado alotipo Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores pueden clasificarse en 'alotipos' e 'isoalotipos'. Estos se distinguen en diferentes bases serológicas que dependen de las fuertes homologías de secuencia entre los isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicos especificados por las formas alélicas de los genes de Ig. Los alotipos representan ligeras diferencias en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de diferentes individuos. Incluso una única diferencia de aminoácidos puede dar lugar a un determinante alotípico, aunque en muchos casos se han producido varias sustituciones de aminoácidos. Los alotipos son diferencias de secuencia entre los alelos de una subclase donde los antiseros reconocen solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que se comparte con una región homóloga no polimórfica de uno o más isotipos diferentes y, por lo tanto, los antiseros reaccionarán con los alotipos relevantes y los isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, Mecanismos de efector de IgG, Chem Immunol. 65: 88-110; Gorman y Clark, 1990, Semin Immunol 2 (6): 457-66).
- Las formas alélicas de las inmunoglobulinas humanas han sido bien caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Además, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54: 1-9). Actualmente, se conocen alotipos de 18 Gm: G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11), 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se heredan en combinaciones fijas se denominan haplotipos Gm. Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden estar sustancialmente codificadas por cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.
- Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden componer un polipéptido Fc, que incluye, entre otros, anticuerpos, Fcs aislados, fragmentos de Fc y fusiones de Fc. En una realización, una inmunoglobulina descrita en el presente documento es un anticuerpo de longitud completa, que constituye la forma biológica natural de un

anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. Para el isotipo IgG, el anticuerpo de longitud completa es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada uno de los cuales tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada una de ellas comprende los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3. En otro caso, las inmunoglobulinas descritas en este documento son regiones Fc aisladas o fragmentos Fc.

Las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden ser una variedad de estructuras, que incluyen, pero no se limitan a fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces referidos aquí como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominados "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb, que consiste en una sola variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están vinculados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos, y (ix) "diacuerpos" o "triabodies", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. Los ejemplos de formatos de anticuerpos y arquitecturas se describen en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23 (9): 1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6: 343-357 y las referencias citadas en el mismo.

En una realización, un anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, también denominado a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden fabricarse de una variedad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, preparadas químicamente o a partir de hibridomas híbridos. En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc y puede incluir parte o toda la región de la bisagra. Para una descripción de los anticuerpos multiespecíficos, véase Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23 (9): 1126-1136 y las referencias citadas en este documento.

Anticuerpos no humanos, quiméricos, humanizados y completamente humanos

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

Los "anticuerpos humanizados" generalmente se refieren a anticuerpos no humanos que han intercambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo, excepto dentro de sus CDR. Las CDR, algunas o todas codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de la lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321: 522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536. La "mutación de retorno" de los residuos seleccionados del marco aceptor a los residuos del donante correspondiente a menudo se requiere para recuperar la afinidad que se pierde en el constructo injertado inicial (US 5.693.762). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto comprenderá típicamente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse utilizando ratones con un sistema inmune de ingeniería genética. Roque et al., 2004, Bio-technol. Prog. 20: 639-654. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica (véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.), y referencias citadas en el mismo). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de repavimentación, como se describe, por ejemplo, en Roguska et al., 1994, Proc. Natl Acad Sci. USA 91: 969-973. En una realización, el anticuerpo parental ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Los métodos basados en la estructura pueden emplearse para la maduración de la humanización y la afinidad, por ejemplo, como se describe en los documentos de EE.UU. N° 11/004.590 (US 2006-0008883 A1). Los métodos basados en la selección pueden emplearse para humanizar y/o afinar las regiones variables del anticuerpo maduro, es decir, para aumentar la afinidad de la región

variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto de solo partes de las CDR, incluidos, entre otros, los métodos descritos en USSN 09/810,502 (US 2002-0034765 A1); Tan et al., 2002, J. Immunol. 169: 1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169: 3076-3084. Los métodos basados en la estructura pueden emplearse para la maduración de la humanización y la afinidad, por ejemplo, como se describe en USSN 10/153,159 (US 2002-0177170 A1) y solicitudes relacionadas. En ciertas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce utilizando un método descrito en Lazar et al., 2007, Mol Immunol 44: 1986-1998 y USSN 11/004,590 (US 2006-0008883 A1), titulado "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", presentado el 3 de diciembre de 2004.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano con al menos una modificación como se describe en este documento. "Anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano con las modificaciones descritas en este documento. Pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos (Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8: 455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos combinados con métodos de selección (Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9: 102-108). En una realización, los anticuerpos humanos equivalentes pueden generarse computacionalmente como se describe en PCT/US09/41144 (WO2009/129538 A2).

#### Anticuerpos anti-IgE

Las inmunoglobulinas descritas aquí se unen a IgE. Los anticuerpos anti-IgE de la invención pueden comprender cualquier región variable, conocida o no conocida, que tenga especificidad por la IgE. Los anticuerpos anti-IgE conocidos incluyen, pero no se limitan a los anticuerpos murinos MaE11, MaE13 y MaE15, versiones humanizadas y/o modificadas de estos anticuerpos que incluyen E25, E26 y E27, particularmente E25, también conocido como rhuMab-E25, también conocido como Omalizumab, como los descritos en los documentos US6761889, US6329509, US20080003218A1, y Presta, LG et al., 1993, J Immunol 151: 2623-2632. Una versión de ingeniería preferida de MaE11 es H1L1 MaE11, descrita en los Ejemplos de este documento. Otros anti-IgE que pueden ser útiles para la invención incluyen el anticuerpo murino TES-C21, el TES-C21 quimérico, también conocido como CGP51901 (Corne, J et al., 1997, J Clin Invest 99: 879-887; Racine-Poon, A et al., 1997, Clin Pharmacol Ther 62: 675-690), y versiones humanizadas y/o diseñadas de este anticuerpo, que incluyen pero no se limitan a CGP56901, también conocido como TNX-901, como los anticuerpos descritos en Kolbinger, F et al., 1993, Protein Eng 6: 971-980. Otros anticuerpos anti-IgE que pueden encontrar uso para la invención se describen en los documentos US6066718, US6072035, PCT/US04/2894 (WO2004/070011 A2), US5342924, US5091313, US5449760, US5543144, US5342924 y US5614611. Otros anticuerpos anti-IgE útiles incluyen el anticuerpo murino BSW17. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de la región variable y las CDR de algunos de estos anticuerpos se proporcionan en la Figura 5.

#### Variantes de Fc y propiedades de unión del receptor de Fc

Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden comprender una variante de Fc. Una variante de Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un polipéptido Fc parental, en el que las modificaciones de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Una variante de Fc descrita en este documento difiere en la secuencia de aminoácidos de su progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por lo tanto, las variantes de Fc descritas en este documento tienen al menos una modificación de aminoácido en comparación con el progenitor. Alternativamente, las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden tener más de una modificación de aminoácidos en comparación con la matriz, por ejemplo, de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente uno a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., en comparación con el parental. Por lo tanto, las secuencias de las variantes de Fc y las del polipéptido de Fc parental son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las variantes de la variante de Fc en este documento poseerán aproximadamente el 80% de homología con la secuencia de la variante Fc parental, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90% de homología, al menos aproximadamente el 95% de homología, al menos aproximadamente el 98% de homología, al menos aproximadamente el 99% homología, etc. Las modificaciones descritas en este documento incluyen modificaciones de aminoácidos, que incluyen inserciones, deleciones y sustituciones. Las modificaciones descritas en el presente documento también incluyen modificaciones de glicofoma. Las modificaciones se pueden hacer genéticamente usando biología molecular, o se pueden hacer enzimáticamente o químicamente.

Las variantes de Fc descritas en este documento se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, S267E es una variante de Fc con la sustitución S267E en relación con el polipéptido Fc parental. Del mismo modo, S267E/L328F define una variante de Fc con las sustituciones S267E y L328F en relación con el polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT puede no estar especificada, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se denomina 267E/328F. Se observa que el orden en que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, que, por ejemplo, 267E/328F es la misma variante de Fc que 328F/267E, etcétera. A menos que se indique lo contrario, las posiciones aquí discutidas están numeradas según el índice de la UE o el esquema de numeración de la UE (Kabat et al., 1991, SSequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice de EU como en Kabat o el esquema de

numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo de la UE (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85).

Las variantes de Fc de la invención descrita en el presente documento se basan en secuencias de IgG humanas y, por lo tanto, se utilizan secuencias de IgG humanas como las secuencias "base" contra las que se comparan otras secuencias, incluidas, entre otras, secuencias de otros organismos, por ejemplo, roedores y primates. Las secuencias de inmunoglobulinas también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgD, IgM y similares. Se contempla que, aunque las variantes de Fc descritas en el presente documento se diseñan en el contexto de una IgG parental, las variantes se pueden diseñar o "transferir" al contexto de otra, la segunda IgG parental. Esto se hace determinando los residuos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y la segunda IgG, típicamente basadas en la secuencia u homología estructural entre las secuencias de la primera y la segunda IgG. Con el fin de establecer una homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG descrita en este documento se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, utilizar uno o más de los programas de alineación de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, utilizando residuos conservados entre especies), permitiendo las inserciones y eliminaciones necesarias para mantener la alineación (es decir, evitar la eliminación de residuos conservados a través de delección e inserción arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera inmunoglobulina. La alineación de los residuos conservados puede conservar el 100% de dichos residuos. Sin embargo, una alineación de más del 75% o tan poco como el 50% de los residuos conservados también es adecuada para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también se pueden definir mediante la determinación de homología estructural entre una primera y segunda IgG que está en el nivel de la estructura terciaria para las IgG cuyas estructuras se han determinado. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto de aminoácido particular del progenitor o precursor (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de aproximadamente 0,13 nm, después de la alineación. En otra realización, los residuos equivalentes están dentro de aproximadamente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se logra después de que el mejor modelo se haya orientado y posicionado para proporcionar la superposición máxima de las coordenadas atómicas de los átomos de proteínas no hidrogenadas de las proteínas. Independientemente de cómo se determinen los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG parental en la que se fabrican las IgG, lo que se pretende transmitir es que las variantes Fc descubiertas como se describen en el presente documento se pueden diseñar en cualquier segunda IgG parental que tiene secuencia significativa u homología estructural con la variante Fc. Así, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en el que el anticuerpo parental es IgG1 humano, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante se puede diseñar en otro anticuerpo parental IgG1 que se une a un antígeno diferente, anticuerpo parental IgG2 humano, un anticuerpo parental IgA humano, un anticuerpo parental IgG2a o IgG2b de ratón, y similares. De nuevo, como se describió anteriormente, el contexto de la variante de Fc parental no afecta la capacidad de transferir las variantes de Fc descritas en este documento a otras IgG parentales.

Las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden optimizarse para una variedad de propiedades de unión al receptor de Fc. En este documento, una variante de Fc diseñada o prevista para mostrar una o más propiedades optimizadas se denomina "variante de Fc optimizada". Las propiedades que pueden optimizarse incluyen, pero no se limitan a, afinidad mejorada o reducida para un FcγR. En una realización, las variantes de Fc descritas en el presente documento están optimizadas para poseer afinidad mejorada por un receptor inhibitorio FcγRIIb. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento proporcionan una afinidad mejorada por FcγRIIb, pero a la vez reducen la afinidad por uno o más FcγR activadores, que incluyen, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR pueden expresarse en células de cualquier organismo que incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, monos cynomolgus y ratones. Las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden optimizarse para que posean una afinidad mejorada por FcγRIIb humano.

Por "mayor afinidad" o "afinidad mejorada" o "afinidad mejorada" o "mejor afinidad" que un polipéptido Fc parental, como se usa en este documento, se entiende que una variante de Fc se une a un receptor Fc con una constante de asociación de equilibrio significativamente mayor ( $K_A$  o  $K_a$ ) o una menor constante de equilibrio de disociación ( $K_D$  o  $K_d$ ) que el polipéptido Fc parental cuando las cantidades de polipéptido variante y parental en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante de Fc con afinidad de unión al receptor Fc mejorada puede mostrar de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces la mejora en la afinidad de unión al receptor de Fc en comparación con el polipéptido Fc parental, donde la afinidad de unión al receptor de Fc se determina, por ejemplo, mediante los métodos de unión descritos en el presente documento que incluyen, pero no se limitan a, Biacore, por un experto en la técnica. En consecuencia, por "afinidad reducida" en comparación con un polipéptido Fc matriz tal como se usa en el presente documento se entiende que una variante de Fc se une a un receptor Fc con significativamente menor  $K_A$  o superior  $K_D$  que el polipéptido Fc parental. La afinidad mayor o reducida también se puede definir en relación con un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, según los datos del presente documento, WT (nativo) IgG1 se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 2 mM, o aproximadamente 2000 nM. Además, algunas variantes de Fc descritas aquí se unen a FcγRIIb con una afinidad aproximadamente 10 veces mayor a WT IgG1. Como se describe aquí, afinidad mayor o mejorada significa tener una  $K_D$  inferior a aproximadamente 100 nM, por ejemplo entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM, o inferior

a aproximadamente 1 nM.

Los anticuerpos anti-IgE de la invención tienen preferiblemente una alta afinidad por FcγRIIb. Por alta afinidad se entiende aquí que la afinidad de la interacción entre el anticuerpo y FcγRIIb es más fuerte que 100 nM. Es decir, que la constante de disociación de equilibrio Kd para la unión del anticuerpo a FcγRIIb es inferior a 100 nM.

- 5 En una realización, las variantes de Fc proporcionan una afinidad mejorada selectivamente a FcγRIIb con respecto a uno o más receptores de activación. La afinidad mejorada selectivamente significa que la variante Fc tiene una afinidad mejorada para FcγRIIb en relación con el(los) receptor(es) activador(es) en comparación con el polipéptido Fc parental, pero tiene una afinidad reducida para el(los) receptor(es) activador(es) en comparación con el polipéptido Fc parental significa que la variante de Fc tiene una afinidad mejorada tanto para FcγRIIb como para los receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc parental, sin embargo, la mejora en la afinidad es mayor para FcγRIIb que para el(los) receptor(es) de activación. En realizaciones alternativas, las variantes de Fc reducen o anulan la unión a una o más FcγR activantes, reducen o anulan la unión a una o más proteínas del complemento, reducen o anulan una o más funciones efectoras mediadas por FcγR, y/o reducen o anulan una o más Funciones efectoras mediadas por el complemento.
- 10
- 15 La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγR proporciona otro parámetro que afecta la utilidad terapéutica de las variantes de Fc descritas en este documento. Considerando que la especificidad y selectividad de una variante de Fc dada para las diferentes clases de FcγRs afecta significativamente la capacidad de una variante de Fc para apuntar un antígeno dado para el tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o selectividad de una variante de Fc para diferentes formas polimórficas de estos los receptores pueden, en parte, determinar qué investigación o experimentos preclínicos pueden ser apropiados para las pruebas y, en última instancia, qué poblaciones de pacientes pueden o no responder al tratamiento. Por lo tanto, la especificidad o selectividad de las variantes de Fc descritas en el presente documento para los polimorfismos del receptor de Fc, que incluyen, pero no se limitan a, FcγRIIa, FcγRIIIa y similares, se pueden usar para guiar la selección de investigaciones válidas y experimentos preclínicos, diseño de ensayos clínicos, selección de pacientes, dependencia de la dosificación y/u otros aspectos relacionados con los ensayos clínicos.
- 20
- 25

Las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con receptores de Fc distintos de los FcγR, que incluyen, pero no se limitan a proteínas de complemento, FcRn y homólogos de receptores de Fc (FcRHs). Los FcRH incluyen, pero no se limitan a, FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5 y FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reseñas 190: 123-136).

- 30 Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante de Fc dada para tratar una enfermedad dada es el contexto de la variante de Fc. Por lo tanto, la selectividad o especificidad del receptor Fc de una variante Fc dada proporcionará diferentes propiedades dependiendo de si compone un anticuerpo, fusión Fc o variantes Fc con una pareja de fusión acoplado. En una realización, una especificidad de receptor de Fc de la variante de Fc descrita en el presente documento determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante de Fc dada para fines terapéuticos dependerá del epítipo o la forma del antígeno diana y la enfermedad o indicación que se esté tratando. Para algunas dianas e indicaciones, una mayor afinidad por FcγRIIb y una reducción de las funciones efectoras mediadas por FcγR pueden ser beneficiosas. Para otros antígenos diana y aplicaciones terapéuticas, puede ser beneficioso aumentar la afinidad por FcγRIIb, o aumentar la afinidad tanto por FcγRIIb como por los receptores de activación.
- 35

- 40 Medios para optimizar la actividad de los anticuerpos anti-IgE

Aquí se describen medios para alterar la afinidad a uno o más FcγRs. En un caso preferido, la afinidad se altera con el receptor inhibidor FcγRIIb, lo que altera la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en una o más funciones efectoras inhibitorias mediadas por FcγRIIb. Los medios incluyen modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, medios posicionales para optimizar la función, medios de sustitución para optimizar la función, etc.) y modificaciones de glicofomas (por ejemplo, medios para modificaciones de glicofomas).

45

#### Modificaciones de aminoácidos

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

50

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

En particular, los medios de sustitución para optimizar la actividad de los anticuerpos anti-IgE, por ejemplo, al alterar la afinidad por FcγRIIb, incluyen, pero no se limitan a, una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una o más de las sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones de la región constante de la cadena pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice EU. Adecuadamente, los medios de sustitución incluyen al menos una (por ejemplo, dos o más) sustitución(es) en comparación con una región Fc parental, en la que dicha(s) modificación(es) se encuentra(n) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, según el índice EU. De manera adecuada, los medios de subestación incluyen una o más (por ejemplo, dos o más) subestaciones en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, según el índice EU.

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

Adecuadamente, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328 y 328/332, en donde la numeración es según un índice de EU. Adecuadamente, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328, en donde la numeración es según un índice EU. Adecuadamente, dichos medios de sustitución son al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de sustituciones) seleccionadas del grupo que consiste en 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 234E/328F, 234W/239D, 234W/239E, 234W/267E, 234W/328Y, 235D/267E, 235D/328F, 235F/239D, 235F/267E, 235F/328Y, 235Y/236D, 235Y/239D, 235Y/267D, 235Y/267E, 235Y/268E, 235Y/328F, 236D/239D, 236D/267E, 236D/268E, 236D/328F, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 239D/268D, 239D/268E, 239D/327D, 239D/328F, 239D/328W, 239D/328Y, 239D/332E, 239E/267E, 266M/267E, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267E/327D, 267E/327E, 267E/328F, 267E/328I, 267E/328Y, 267E/332E, 268D/327D, 268D/328F, 268D/328W, 268D/328Y, 268D/332E, 268E/328F, 268E/328Y, 327D/328Y, 328F/332E, 328W/332E, y 328Y/332E, en donde la numeración es según un índice EU.

Adecuadamente, dichos medios de sustitución dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es de acuerdo con un índice de la UE. Adecuadamente, dichos medios de sustitución dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D,

236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, EP 2 703 415 B1 19 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332EE, en donde la numeración está de acuerdo con un índice de la UE. Adecuadamente, dichos medios de sustitución dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 267H, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 327M, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 330Q, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E, y 239D/268D/328Y/332E.

Adecuadamente, dichos medios de sustitución dan como resultado al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F, en donde la numeración es según un índice EU.

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

#### Modificaciones de glicoforma

Muchos polipéptidos, incluidos los anticuerpos, se someten a una variedad de modificaciones postraduccionales que implican restos de carbohidratos, como la glicosilación con oligosacáridos. Hay varios factores que pueden influir en la glicosilación. Se ha demostrado que todas las especies, tejidos y tipos de células son importantes en la forma en que se produce la glicosilación. Además, el medio ambiente extracelular, a través de condiciones de cultivo alteradas, como la concentración en suero, puede tener un efecto directo sobre la glicosilación (Lifely et al., 1995, *Glycobiology* 5 (8): 813-822).

Todos los anticuerpos contienen carbohidratos en posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo tiene una variedad distinta de estructuras de carbohidratos ligadas a N. Aparte del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta el 30% de las IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. IgG tiene un solo carbohidrato biantenarico ligado a N en Asn297 del dominio CH2. Para la IgG de suero o producida ex vivo en hibridomas o células modificadas por ingeniería genética, las IgG son heterogéneas con respecto al carbohidrato unido a Asn297 (Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163: 59-76; Wright et al., 1997, *Trends Biotech* 15: 26-32). Para la IgG humana, el oligosacárido central normalmente consiste en GlcNAc<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>GlcNAc, con diferente número de residuos externos.

Los restos de carbohidratos de las inmunoglobulinas descritos en el presente documento se describirán con referencia a la nomenclatura comúnmente utilizada para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química de los carbohidratos que utiliza esta nomenclatura se encuentra en Hubbard et al. 1981, *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa la manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa; y Glc, que representa la glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la notación abreviada NeuNAc, para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para el

## 5-glicolilneuramínico.

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos entre sí, por ejemplo, de dos a aproximadamente doce azúcares simples unidos entre sí) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacáridos están unidas típicamente a la columna vertebral de la glicoproteína a través de enlaces de N o de O. Los oligosacáridos de las inmunoglobulinas descritos en el presente documento generalmente se unen a un dominio CH2 de una región Fc como oligosacáridos ligados a N. "Glicosilación ligada a N" se refiere a la unión del resto de carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El experto en la materia reconocerá que, por ejemplo, cada uno de los dominios IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murinos, así como los dominios IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanos tienen un sitio único para la glicosilación ligada a N en el aminoácido 297 (Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Para los fines de este documento, una "estructura de carbohidrato central madura" se refiere a una estructura de carbohidrato central procesada unida a una región Fc que generalmente consiste en la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc (Fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)<sub>2</sub> típica de oligosacáridos biantenarios. La estructura de carbohidratos del núcleo maduro está unida a la región Fc de la glicoproteína, generalmente a través del enlace de N a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc. Un "bisección GlcNAc" es un residuo de GlcNAc unido a la manosa β1,4 de la estructura de carbohidrato del núcleo maduro. La bisección de GlcNAc se puede unir enzimáticamente a la estructura de carbohidrato del núcleo maduro mediante la enzima p (1,4)-N-acetilglucosaminiltrans-ferasa III (GnTIII). Las células CHO normalmente no expresan GnTIII (Stanley et al., 1984, J. Biol. Chem. 261: 13370-13378), pero pueden diseñarse para hacerlo (Umana et al., 1999, Nature Biotech. 17: 176- 180).

En este documento se describen variantes de Fc que comprenden glicofomas modificadas o glicofomas modificadas por ingeniería genética. Por "glicofoma modificada" o "glicofoma modificada por ingeniería genética", como se usa en este documento, se entiende una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una proteína original. Las glicofomas diseñadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, entre otros, mejorar o reducir la función efectora mediada por FcγR. Adecuadamente, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden modificarse para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o biseccionados que están unidos covalentemente a la región Fc.

Una variedad de métodos son bien conocidos en la técnica para generar glicofomas modificadas (Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278: 3466-3473); (US 6.602.684; USSN 10/277.370 (US 2003-0157108); USSN 10/113.929 (US 2003-0003097 A1); PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1 ); (Tecnología Potelligent™ [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ [GLYCART biotechnology AG, Zürich, Suiza]). Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o biseccionados que se unen covalentemente a la región Fc, por ejemplo, expresando una IgG en varios organismos o líneas celulares, modificadas por ingeniería genética o de otro tipo (por ejemplo, células CHO de Lec-13 o hibridomas de rata). Células YB2/0, regulando las enzimas involucradas en la vía de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α1,6-fucosyltransferase]) y/o β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando el carbohidrato (s) después de la expresión de IgG. Otros métodos para modificar las glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento incluyen el uso de cepas de levadura (Li et al., 2006, Nature Biotechnology 24 (2): 210-215), musgo (Nechansky et al., 2007, Mol Immunol 44 (7): 1826-8), y plantas (Cox et al., 2006, Nat Biotechnol 24 (12): 1591-7). El uso de un método particular para generar una glicofoma modificada no pretende limitar las realizaciones a ese método. Más bien, las realizaciones descritas en el presente documento abarcan variantes de Fc con glicofomas modificadas independientemente de cómo se producen.

Adecuadamente, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento están diseñadas por ingeniería genética para alterar el nivel de sialilación. Los niveles más altos de glicanos Fc sialilados en las moléculas de inmunoglobulina G pueden afectar negativamente a la funcionalidad (Scallon et al., 2007, Mol Immunol. 44 (7): 1524-34), y las diferencias en los niveles de sialilación de Fc pueden dar como resultado una actividad antiinflamatoria modificada (Kaneko et al., 2006, Science 313: 670-673). Debido a que los anticuerpos pueden adquirir propiedades antiinflamatorias tras la sialilación del polisacárido del núcleo de Fc, puede ser ventajoso para el glicoingeniería las inmunoglobulinas descritas en este documento para un contenido mayor o reducido de ácido siálico en Fc.

La glicofoma diseñada típicamente se refiere a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; así, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma diseñada por ingeniería genética. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la inmunoglobulina que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos. Adecuadamente, una composición descrita en el presente documento comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, por ejemplo, 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc. del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo maduro que carece de fucosa. Adecuadamente, el anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa y además comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En un caso alternativo, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100%, del anticuerpo en la composición comprende un carbohidrato central maduro con una estructura que carece de ácido siálico. En otro caso, el anticuerpo

5 en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de ácido siálico y además comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En otro caso más, una composición comprende una variante de Fc glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente el 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100%, del anticuerpo en la composición comprende un carbohidrato de núcleo maduro con una estructura que contiene ácido siálico. Adecuadamente, el anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que contiene ácido siálico y además comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. Adecuadamente, la combinación de modificación modificada con glicofoma y aminoácidos proporciona propiedades de unión del receptor Fc óptimas al anticuerpo.

#### Otras modificaciones

10 Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no están específicamente relacionadas con funciones efectoras mediadas por FcγR o complemento de por sí. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácidos, o pueden ser modificaciones que se realizan enzimáticamente o químicamente. Dichas modificaciones probablemente proporcionan alguna mejora en la inmunoglobulina, por ejemplo, una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. En  
15 en el presente documento se describen diversas mejoras que pueden realizarse al acoplar las inmunoglobulinas descritas en el presente documento con modificaciones adicionales.

Adecuadamente, la región variable de un anticuerpo descrito en el presente documento puede madurar por afinidad, es decir, que se han realizado modificaciones de aminoácidos en los dominios VH y/o VL del anticuerpo para potenciar la unión del anticuerpo a su antígeno diana. Dichos tipos de modificaciones pueden mejorar la asociación y/o la cinética de disociación para unirse al antígeno diana. Otras modificaciones incluyen aquellas que mejoran la selectividad para el antígeno diana frente a dianas alternativas. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad para el antígeno expresado en células diana frente a células no diana. Otras mejoras a las propiedades de reconocimiento de destino pueden ser proporcionadas por modificaciones adicionales. Dichas propiedades pueden incluir, pero no se limitan a, propiedades cinéticas específicas (es decir, cinética de asociación y disociación), selectividad para la diana particular frente a dianas alternativas, y selectividad para una forma específica de dianas frente a formas alternativas. Los ejemplos incluyen las variantes de longitud completa frente a las de empalme, la superficie celular frente a las formas solubles, la selectividad para diversas variantes polimórficas o la selectividad para formas conformacionales específicas del antígeno diana. Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan una internalización reducida o mejorada de una inmunoglobulina.

30 Adecuadamente, se realizan modificaciones para mejorar las propiedades biofísicas de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a, estabilidad, solubilidad y estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la inmunoglobulina para proporcionar una mayor estabilidad, o la sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares para una mayor solubilidad. Otras modificaciones a las inmunoglobulinas descritas en el presente documento incluyen aquellas que permiten la formación específica o moléculas homodiméricas u homomultiméricas. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, disulfuros de ingeniería, así como modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar homodímeros u homodímeros covalentes. Las modificaciones adicionales a las variantes descritas en el presente documento incluyen aquellas que permiten la formación específica o moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales y/o multifuncionales. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio CH3, en las que las sustituciones reducen la formación de homodímeros y aumentan la formación de heterodímeros. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios de bisagra y CH3, en las que las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

45 Adecuadamente, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento comprenden modificaciones que eliminan los sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasa que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasa que degradan la proteína administrada *in vivo*. Adecuadamente, se realizan modificaciones adicionales para eliminar los sitios de degradación covalente, como la deamidación (es decir, la desamidación de los residuos de glutaminilo y asparaginilo en los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes), la oxidación y los sitios de degradación proteolítica. Los sitios de desamidación que son particularmente útiles para eliminar son aquellos que tienen una mayor propensión a la desamidación, que incluyen, pero no se limitan a, residuos de asparaginilo y glutamilo seguidos de glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En tales casos, la sustitución de cualquier residuo puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Los sitios de oxidación comunes incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que pueden introducirse o eliminarse, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos serilo o treonilo, la metilación de los "grupos amino de la lisina, la arginina y las cadenas laterales de histidina (TE Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Las modificaciones adicionales también pueden incluir, pero no se limitan a, modificaciones postraduccionales, como la glicosilación y la fosforilación ligadas a N o ligadas a O.

60 Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran la expresión y/o los rendimientos de purificación de huéspedes o células huésped comúnmente utilizadas para la producción de productos biológicos. Estos incluyen, pero no se

limitan a, varias líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, CHO), líneas celulares de levadura, líneas celulares bacterianas y plantas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro entre cadenas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracatenarios.

Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados utilizando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colegas, que incluyen, pero no se limitan a, los métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20 (12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc. Natl Acad Sci. USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303 (5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301 (5635): 964-7. Adecuadamente, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades funcionales, biofísicas, inmunológicas o de fabricación discutidas anteriormente. Adecuadamente, estas modificaciones permiten la modificación química adicional para otros propósitos. Otras modificaciones se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede unirse a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Se pueden realizar modificaciones de aminoácidos adicionales para permitir la modificación química o postraduccional específica o no específica de las inmunoglobulinas. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, PEGilación y glicosilación. Las sustituciones específicas que pueden utilizarse para permitir la PEGilación incluyen, pero no se limitan a, la introducción de nuevos restos de cisteína o aminoácidos no naturales, de modo que se puedan usar químicas de acoplamiento eficiente y específica para unir un PEG o un resto polimérico. La introducción de sitios de glicosilación específicos se puede lograr mediante la introducción de nuevas secuencias NXT/S en las inmunoglobulinas descritas en el presente documento.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia original a proteínas MHC. Por ejemplo, las modificaciones de los aminoácidos se diseñarán de manera tal que no haya o haya un número mínimo de epítopos inmunes que se prediga que se unan, con alta afinidad, a cualquier alelo MHC prevalente. Varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en secuencias de proteínas se conocen en la técnica y se pueden usar para puntuar epítopos en un anticuerpo descrito en el presente documento. Véanse, por ejemplo, los documentos USSN 09/903,378 (US 2002-0114492 A1), USSN 10/754,296 (US 2004-0230380 A1), USSN 11/249,692 (US 2006-0148009 A1), y las referencias citadas allí.

Adecuadamente, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden combinarse con inmunoglobulinas que alteran la unión de FcRn. Dichas variantes pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas a las inmunoglobulinas. Las variantes preferidas que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, que incluyen pero no se limitan a, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M (PCT/US2008/088053 (WO2009086320 A1), presentada el 22 de diciembre de 2008, titulada "Fc Variants with Altered Binding to FcRn"). Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no se limitan a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9): 6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311 S (Dall'Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, The Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524).

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos se incluyen dentro del alcance de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento, y generalmente, pero no siempre, se realizan después de la traducción. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente de derivación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C terminales.

En algunos casos, la modificación covalente de los anticuerpos descritos en el presente documento comprende la adición de una o más etiquetas. El término "etiqueta" significa cualquier etiqueta detectable. En algunos casos, la etiqueta está acoplada al anticuerpo a través de brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico. Se conocen diversos métodos para marcar proteínas en la técnica y se pueden usar para generar inmunoglobulinas descritas en el presente documento.

#### Conjugados

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento son "proteínas de fusión" de anticuerpos, a veces referidas aquí como "conjugados de anticuerpos". La pareja de fusión o pareja conjugada puede ser proteinácea o no proteica; esta última se genera generalmente usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero conjugado. El conjugado y los compañeros de fusión pueden ser cualquier molécula, incluidos los compuestos químicos de molécula pequeña y los polipéptidos. Por ejemplo, una variedad de conjugados de anticuerpos y métodos se describen en Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11: 584-588. las posibles parejas conjugadas incluyen, pero no se limitan a, citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de la tirosina quinasa y otros agentes terapéuticamente

activos. En algunos casos, las parejas conjugadas pueden considerarse más como cargas útiles, es decir, que el objetivo de un conjugado es la administración dirigida de la pareja conjugada a una célula específica, por ejemplo, una célula cancerosa o una célula inmune, por la inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la conjugación de una toxina con una inmunoglobulina se dirige al suministro de dicha toxina a las células que expresan el antígeno diana. Como apreciará un experto en la técnica, en realidad los conceptos y definiciones de fusión y conjugado se superponen. La designación de una fusión o conjugado no pretende limitarla a ninguna realización particular descrita en el presente documento. Más bien, estos términos se usan de manera general para transmitir el concepto amplio de que cualquier inmunoglobulina descrita en el presente documento puede vincularse genéticamente, químicamente o de otra manera, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Los conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, etiquetas como se describen a continuación, fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de tales toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen productos radioquímicos producidos mediante la conjugación de radioisótopos a anticuerpos, o la unión de un radionúclido a un agente quelante que se ha unido covalentemente al anticuerpo. Los casos adicionales utilizan caliqueamicina, auristatínas, geldanamicina, maitansina y duocarmicinas y análogos.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento se fusionan o conjugan con una citoquina. Por "citoquina", como se usa en el presente documento, se entiende un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et al., 2001, J. Immunol. Mé Penichet et al., 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, cytokines may be fused to antibody to provide an array of desirable properties Ejemplos de dichas citocinas son las linfoquinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen la hormona del crecimiento, como la hormona del crecimiento humano, la hormona del crecimiento humano N-metionilo y la hormona del crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina prorelaxina; hormonas glicoproteínas como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden conjugarse con un "receptor" (como estreptavidina) para su utilización en la selección previa de tumores en donde el conjugado inmunoglobulina-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente de limpieza y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En un caso alternativo, la inmunoglobulina se conjuga o se une operativamente a una enzima para emplear la terapia de profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT). La ADEPT se puede usar conjugando o uniendo operativamente la inmunoglobulina a una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo).

Cuando se usan compañeros de inmunoglobulina como conjugados, los compañeros de conjugado pueden estar vinculados a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en el presente documento, incluso en los extremos N o C, o en algún residuo entre los extremos. Una variedad de enlazadores puede encontrar uso en las inmunoglobulinas descritas en el presente documento para enlazar covalentemente a los compañeros conjugados con una inmunoglobulina. Por "enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de los mismos, en este documento se entiende una molécula o grupo de moléculas (como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y con frecuencia sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los enlazadores homo o heterofuncionales son bien conocidos (véase, 1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200). Se pueden usar varias estrategias para unir covalentemente las moléculas entre sí. Estos incluyen, pero no se limitan a, enlaces polipeptídicos entre los extremos N y C de las proteínas o dominios de proteínas, enlaces a través de enlaces disulfuro y enlaces a través de reactivos de reticulación química. En un caso, el enlazador es un enlace peptídico, generado por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes restos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud adecuada para unir dos moléculas de tal manera que asuman la conformación correcta entre sí para que conserven la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. Adecuadamente, el enlazador tiene una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos, por ejemplo,

un enlazador puede tener una longitud de 1 a 20 aminoácidos. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (incluidos, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEC ID N°: 1), (GGGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEC ID N°: 2) y (GGGS)<sub>n</sub> (establecido como SEC ID N°: 3), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como apreciarán los expertos en la técnica. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden ser utilizados como enlazadores.

#### Producción de moléculas de co-acoplamiento

En el presente documento también se describen métodos para producir y ensayar experimentalmente moléculas de co-acoplamiento. Los métodos descritos no pretenden restringir las realizaciones a ninguna aplicación particular o teoría de operación. Más bien, los métodos proporcionados pretenden ilustrar en general que una o más inmunoglobulinas pueden producirse y probarse experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales para la biología molecular de los anticuerpos, la expresión, la purificación y el cribado se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5: 683-689; Maynard y Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-76; *Anticuerpos: A Laboratory Manual* by Harlow & Lane, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En una realización descrita en el presente documento, se crean ácidos nucleicos que codifican las moléculas de co-acoplamiento, y que después pueden clonarse en células huésped, expresarse y analizarse, si se desea. Por lo tanto, se pueden producir ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifican cada secuencia proteica. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en este documento se describen en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como apreciarán los expertos en la técnica, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un gran número de secuencias es potencialmente costosa y consume mucho tiempo. Por "biblioteca" en el presente documento se entiende un conjunto de variantes en cualquier forma, que incluye, pero no se limita a una lista de secuencias de ácido nucleico o aminoácido, una lista de sustituciones de ácido nucleico o aminoácido en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifique las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprenda las proteínas variantes, ya sea en forma purificada o no purificada. Por consiguiente, hay una variedad de técnicas que pueden usarse para generar eficientemente bibliotecas descritas en este documento. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de ensamblaje de genes, métodos basados en PCR y métodos que utilizan variaciones de la PCR, métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, métodos de oligo combinados, como los que se utilizan en el barajado sintético, métodos de amplificación propensos a errores y métodos que use oligos con mutaciones aleatorias, métodos clásicos de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis en casete y otros métodos de amplificación y síntesis génica. Como se conoce en la técnica, hay una variedad de kits y métodos disponibles comercialmente para el ensamblaje de genes, mutagénesis, subclonación de vectores y similares, y dichos productos comerciales encuentran uso para generar ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden producirse cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las moléculas de co-acoplamiento, en las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y un experto en la técnica las determinará fácilmente mediante experimentación rutinaria. Se puede usar una amplia variedad de células huésped apropiadas, que incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, bacterias, células de insectos y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en este documento se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible en la American Type Culture Collection.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, incluidos los sistemas en los que las construcciones de expresión se introducen en las células de mamíferos usando virus tales como retrovirus o adenovirus. Se puede usar cualquier célula de mamífero, por ejemplo, células humanas, de ratón, de rata, de hámster y de primate. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, células Jurkat T, células NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, NS0 y sus variantes. Adecuadamente, las proteínas de la biblioteca se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacterianos son bien conocidos en la técnica e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*. Adecuadamente, las inmunoglobulinas se producen en células de insecto (por ejemplo, Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento se expresan *in vitro* utilizando sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de traducción *in vitro* derivados tanto de células procarióticas (por ejemplo, *E. coli*) como eucarióticas (por ejemplo, germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y pueden seleccionarse en función de los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, tal como lo aprecian los expertos en la técnica, se requiere la traducción *in vitro* para algunas tecnologías de visualización, por ejemplo, la visualización de ribosomas. Además, las inmunoglobulinas pueden producirse por métodos de síntesis química. También los sistemas de expresión transgénicos, tanto animales (por ejemplo, leche de vaca, oveja o cabra,

huevos de gallina embrionados, larvas de insectos enteros, etc.) como plantas (por ejemplo, maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.)

Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar la proteína. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores o vectores extracromosómicos auto-replicantes que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula huésped. Por lo tanto, los vectores de expresión que encuentran uso en la generación de inmunoglobulinas descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, los que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras y sistemas *in vitro*. Como se conoce en la técnica, una variedad de vectores de expresión está disponibles, comercialmente o de otra manera, que pueden encontrar uso para expresar moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en el presente documento se entiende que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. En general, estos vectores de expresión incluyen ácidos nucleicos reguladores de la transcripción y la traducción unidos de manera operativa al ácido nucleico que codifica la molécula de co-acoplamiento, y son típicamente apropiados para la célula huésped utilizada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosomal, secuencias de inicio y detención de la transcripción, secuencias de inicio y detención de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión típicamente contienen un gen o marcador de selección para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada.

Las moléculas de acoplamiento pueden estar unidas operativamente a una pareja de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, la purificación, el cribado, la visualización y similares. Las parejas de fusión pueden estar vinculadas a la secuencia de inmunoglobulina a través de secuencias de enlace. La secuencia del enlazador generalmente comprenderá un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también se pueden usar enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede usarse como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia de enlace común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Una pareja de fusión puede ser una secuencia de señal o de direccionamiento que dirige la inmunoglobulina y cualquier pareja de fusión asociada a una ubicación celular deseada o a los medios extracelulares. Como se sabe en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína que se secreta en los medios de crecimiento, o en el espacio periplásmico, ubicado entre la membrana interna y externa de la célula. Una pareja de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o selección. Dichas parejas de fusión incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo, H<sub>6</sub> y H<sub>10</sub> u otras etiquetas para usar con sistemas de Cromatografía de Afinidad de Metales Inmovilizados (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad Ni<sup>+2</sup>)), fusiones GST, fusiones de MBP, etiquetas Strep, la secuencia diana de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas de epítipo que son el blanco de los anticuerpos (por ejemplo, las etiquetas c-myc, etiquetas de bandera y similares). Como apreciarán los expertos en la técnica, dichas etiquetas pueden ser útiles para la purificación, para la selección, o ambos. Por ejemplo, una inmunoglobulina se puede purificar usando una etiqueta His inmovilizándola en una columna de afinidad Ni<sup>+2</sup>, y después, después de la purificación, se puede usar la misma etiqueta His para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta con Ni<sup>+2</sup> para realizar una ELISA u otro ensayo de unión (como se describe a continuación). Una pareja de fusión puede habilitar el uso de un método de selección para detectar inmunoglobulinas (véase a continuación). Las parejas de fusión que permiten una variedad de métodos de selección son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, al fusionar los miembros de una biblioteca de inmunoglobulinas con la proteína del gen III, se puede emplear la presentación de fagos (Kay et al., Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman et al., 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Las parejas de fusión pueden permitir que las inmunoglobulinas sean marcadas. Alternativamente, una pareja de fusión puede unirse a una secuencia específica en el vector de expresión, permitiendo que la pareja de fusión y la inmunoglobulina asociada se unan de forma covalente o no covalente con el ácido nucleico que las codifica. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células huésped son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped utilizada. Las técnicas incluyen, pero no se limitan a, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o de fagos, encapsulación del(los) polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamíferos, la transfección puede ser transitoria o estable.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento se purifican o aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de diversas formas conocidas por los expertos en la materia. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, incluido el intercambio iónico, la interacción hidrófoba, la afinidad, el dimensionamiento o la filtración en gel, y la fase inversa, realizadas a presión atmosférica o a alta presión utilizando sistemas como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, diálisis y cromatofocus. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración,

junto con la concentración de proteínas, también son útiles. Como es bien conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden encontrar uso para la purificación de inmunoglobulinas descritas en el presente documento. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Del mismo modo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como por supuesto lo hace el antígeno diana del anticuerpo. La purificación a menudo puede ser habilitada por un compañero de fusión particular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas se pueden purificar utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión con GST, cromatografía de afinidad Ni<sup>2+</sup> si se emplea una etiqueta His, o un anticuerpo anti-bandera inmovilizado si se usa una etiqueta bandera. Para una guía general sobre técnicas de purificación adecuadas, véase0, por ejemplo, incorporado completamente por referencia Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará según el screen o el uso de las inmunoglobulinas. En algunos casos no es necesaria la purificación. Por ejemplo, en un caso, si las inmunoglobulinas se secretan, la detección puede realizarse directamente desde el medio. Como es bien conocido en la técnica, algunos métodos de selección no implican la purificación de proteínas. Así, por ejemplo, si una biblioteca de inmunoglobulinas se convierte en una biblioteca de presentación de fagos, la purificación de proteínas puede no realizarse.

#### 15 Experimentación in vitro

Las moléculas de co-acoplamiento pueden rastrearse utilizando una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a, los que usan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y tecnologías de selección. La automatización y las tecnologías de detección de alto rendimiento pueden utilizarse en los procedimientos de selección. La detección puede emplear el uso de una pareja o etiqueta de fusión. El uso de parejas de fusión se ha discutido anteriormente. Por "etiquetado" en el presente documento se entiende que las inmunoglobulinas descritas en el presente documento tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una pantalla. En general, los marcadores se dividen en tres clases: a) marcadores inmunitarios, que pueden ser un epítipo incorporado como un socio de fusión reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos pesados o radiactivos, y c) marcadores de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas como la biotina que permiten otros métodos de etiquetado. Las etiquetas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de proteínas.

Adecuadamente, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las moléculas de co-acoplamiento se seleccionan en un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* pueden permitir un amplio intervalo dinámico para las propiedades de selección de interés. Las propiedades que pueden analizarse incluyen, pero no se limitan a, estabilidad, solubilidad y afinidad por los ligandos de Fc, por ejemplo, FcγRs. Múltiples propiedades pueden ser seleccionadas simultáneamente o individualmente. Las proteínas se pueden purificar o no purificar, según los requisitos del ensayo. Adecuadamente, el screen es un ensayo de unión cualitativa o cuantitativa para la unión de moléculas de co-acoplamiento a una proteína o molécula no proteica que se sabe o se cree que se une a la molécula de co-acoplamiento. Adecuadamente, el screen es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. Adecuadamente, el screen es un ensayo para la unión de moléculas de co-acoplamiento a un ligando Fc, que incluye, pero no se limita a la familia de FcγRs, el receptor neonatal FcRn, la proteína del complemento C1q y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos Fc pueden ser de cualquier organismo. Adecuadamente, los ligandos Fc son de seres humanos, ratones, ratas, conejos y/o monos. Los ensayos de unión pueden llevarse a cabo utilizando una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y BRET (transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), AlphaScreen (ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada), Ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), SPR (Resonancia de plasmón de superficie, también conocido como BIACORE®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel y cromatografía, incluida la filtración en gel. Estos y otros métodos pueden aprovechar algún compañero de fusión o etiqueta de la inmunoglobulina. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas.

Las propiedades biofísicas de las moléculas de co-acoplamiento, por ejemplo, la estabilidad y la solubilidad, pueden probarse utilizando una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de la proteína se puede determinar midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegados y desplegados. Por ejemplo, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden desplegarse utilizando desnaturalizante químico, calor o pH, y esta transición puede monitorizarse utilizando métodos que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbancia, espectroscopia de RMN, calorimetría y proteólisis. Como apreciarán los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos de las transiciones de plegado y desplegado también pueden controlarse usando estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural global de una molécula de co-acoplamiento pueden determinarse cuantitativa o cualitativamente utilizando una amplia gama de métodos que se conocen en la técnica. Los métodos que pueden ser útiles para caracterizar las propiedades biofísicas de las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento incluyen electroforesis en gel, enfoque isoelectrico, electroforesis capilar, cromatografía como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, cartografía de péptidos, mapeo de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopia de absorbancia ultravioleta, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de luz, proteólisis y entrecruzamiento, medición de

turbidez, ensayos de retardo de filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión al colorante fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. El análisis estructural que emplea técnicas cristalográficas de rayos X y la espectroscopia de RMN también puede ser útil. Adecuadamente, la estabilidad y/o solubilidad pueden medirse determinando la cantidad de solución de proteína después de un período de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede o no estar expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo, temperatura elevada, pH bajo o la presencia de desnaturizante. Debido a que la función típicamente requiere una proteína estable, soluble y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión mencionados anteriormente también proporcionan formas de realizar dicha medición. Por ejemplo, una disolución que comprende una inmunoglobulina podría analizarse para determinar su capacidad para unirse al antígeno diana, después exponerse a una temperatura elevada durante uno o más períodos de tiempo definidos, y después analizar nuevamente la unión del antígeno. Debido a que no se espera que la proteína desplegada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medida de la estabilidad y solubilidad de la molécula de acoplamiento.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento pueden probarse utilizando uno o más ensayos basados en células o *in vitro*. Para dichos ensayos, las inmunoglobulinas, purificadas o no purificadas, se agregan típicamente de forma exógena, de modo que las células se exponen a variantes individuales o grupos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan típicamente, pero no siempre, en la biología de la capacidad de la inmunoglobulina para unirse al antígeno diana y mediar en algún evento bioquímico, por ejemplo, funciones efectoras como lisis celular, fagocitosis, inhibición de la unión de ligandos/receptores, inhibición del crecimiento y/o proliferación, apoptosis y similares. Dichos ensayos a menudo implican monitorizar la respuesta de las células a la inmunoglobulina, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, la fagocitosis celular, la lisis celular, el cambio en la morfología celular o la activación transcripcional, como la expresión celular de un gen natural o un gen informador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de las moléculas de co-acoplamiento para obtener ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos, es posible que sea necesario agregar células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, por ejemplo, complemento de suero o células efectoras como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los anticuerpos reticulados o monoméricos pueden causar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan el antígeno diana del anticuerpo, o pueden mediar el ataque a las células diana por células inmunes que se han agregado al ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte o viabilidad celular son conocidos en la técnica e incluyen el uso de colorantes, fluoróforos, reactivos inmunquímicos, citoquímicos y radioactivos. Por ejemplo, los ensayos de caspasa o conjugados de anexina-harina pueden permitir la medición de la apoptosis, y la captación o liberación de sustratos radiactivos (por ejemplo, los ensayos de liberación de cromo-51) o la reducción metabólica de los colorantes fluorescentes, como el azul alamar, puede permitir el crecimiento, la proliferación o la activación celular. ser monitoreado En un caso, se utiliza el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA de DELFIA® (Perkin Elmer, MA). Alternativamente, las células diana muertas o dañadas pueden controlarse midiendo la liberación de una o más proteínas intracelulares naturales, por ejemplo lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para evaluar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede controlarse analizando los genes o proteínas naturales que pueden estar regulados por incremento o por disminución, por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleucinas o, alternativamente, la lectura puede realizarse a través de una construcción de luciferasa o indicador GFP. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medida de los cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una inmunoglobulina. Los tipos de células para tales ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y puede emplearse una variedad de líneas celulares que se conocen en la técnica. Alternativamente, las pantallas basadas en células se realizan utilizando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las moléculas de co-acoplamiento.

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

## 50 Experimentación in vivo

Las propiedades biológicas de las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento pueden caracterizarse en experimentos de células, tejidos y organismos completos. Como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se prueban en animales, que incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o un modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, la toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Dichos animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Con respecto a las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento, surge un desafío particular cuando se usan modelos animales para evaluar el potencial de la eficacia en seres humanos de los polipéptidos candidatos: esto se debe, al menos en parte, al hecho de que las moléculas de co-acoplamiento que tienen un efecto específico en la afinidad por un receptor Fc humano puede no tener un efecto de afinidad similar con el receptor animal ortólogo. Estos problemas pueden exacerbarse aún más por las inevitables ambigüedades asociadas con la correcta asignación de los verdaderos ortólogos (Mechetina et al., Immunogenetics, 2002 54: 463-468), y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal (por ejemplo, los seres humanos poseen un FcγRIIIa mientras que los ratones no lo hacen). Los productos terapéuticos a menudo se prueban en ratones,

que incluyen, pero no se limitan a, las cepas de ratón NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y los transgénicos (incluidos los knockins y knockouts). Dichos ratones pueden desarrollar diversas afecciones autoinmunes que se asemejan a patologías de enfermedades inflamatorias o autoinmunes sistémicas a órganos humanos, como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, una inmunoglobulina descrita en el presente documento destinada a enfermedades autoinmunes puede probarse en tales modelos de ratones tratando a los ratones para determinar la capacidad de la inmunoglobulina para reducir o inhibir el desarrollo de la patología de la enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el ratón y el sistema receptor de Fcγ humano, un enfoque alternativo es utilizar un modelo SCID murino en el que los ratones con deficiencia inmunitaria están injertados con PBL o PBMC (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) que proporcionan un humano semi-funcional Sistema inmunológico con células efectoras humanas y receptores Fc. En tal modelo, un desafío de antígeno (como el toxoide tetánico) activa las células B para diferenciarlas en células plasmáticas y segregar inmunoglobulinas, reconstituyendo así la inmunidad humoral específica del antígeno. Por lo tanto, una inmunoglobulina dirigida dual descrita en el presente documento que se une específicamente a IgE y FcγRIIb en células B puede probarse para examinar la capacidad de inhibir específicamente la diferenciación de células B. Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha inmunoglobulina para ser usada como un agente terapéutico. Otros organismos, por ejemplo, mamíferos, también pueden usarse para ensayos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por lo tanto, pueden usarse para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoglobulinas descritas en este documento. Los ensayos de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento en seres humanos son finalmente requeridas para su aprobación como fármacos, y por lo tanto, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Por lo tanto, las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden probarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden conferir un rendimiento superior a las terapias que contienen Fc en modelos animales o en seres humanos. Los perfiles de unión al receptor de tales inmunoglobulinas, como se describe en esta memoria descriptiva, pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la potencia de los fármacos citotóxicos o dirigirse a funciones efectoras específicas o células efectoras para mejorar la selectividad de la acción del fármaco. Además, pueden seleccionarse perfiles de unión al receptor que pueden reducir algunas o todas las funciones efectoras, reduciendo así los efectos secundarios o la toxicidad de dicho fármaco que contiene Fc. Por ejemplo, una inmunoglobulina con unión reducida a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa puede seleccionarse para eliminar la mayor parte de la función efectora mediada por células, o una inmunoglobulina con unión reducida a C1q puede seleccionarse para limitar las funciones efectoras mediadas por el complemento. En algunos contextos, se sabe que tales funciones efectoras tienen efectos tóxicos potenciales. Por lo tanto, eliminarlos puede aumentar la seguridad del fármaco con Fc y dicha seguridad mejorada puede caracterizarse en modelos animales. En algunos contextos, se sabe que dichas funciones efectoras median la actividad terapéutica deseable. Por lo tanto, aumentarlos puede aumentar la actividad o la potencia del fármaco vector de Fc y dicha actividad o potencia mejorada puede caracterizarse en modelos animales.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden evaluarse para determinar su eficacia en modelos animales clínicamente relevantes de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos relevantes incluyen varios animales transgénicos para antígenos y receptores específicos.

Los modelos transgénicos relevantes, como los que expresan los receptores Fc humanos (por ejemplo, CD32b) podrían usarse para evaluar y probar las inmunoglobulinas y las fusiones de Fc en su eficacia. La evaluación de las moléculas de co-acoplamiento mediante la introducción de genes humanos que median directa o indirectamente la función efectora en ratones u otros roedores puede permitir estudios fisiológicos de eficacia en trastornos autoinmunes y AR. Los receptores Fc humanos, como FcγRIIb, pueden poseer polimorfismos como los del promotor génico (-343 de G a C) o el dominio transmembrana del receptor 187 I o T, lo que permitiría además la introducción de polimorfismos específicos y combinaciones de polimorfismos humanos en roedores. Los diversos estudios que involucran polimorfismos FcR no están limitados a esta sección, sin embargo, abarcan todas las discusiones y aplicaciones de los FcR en general como se especifica en esta solicitud. Las inmunoglobulinas descritas en el presente documento pueden conferir una actividad superior a los fármacos que contienen Fc en dichos modelos transgénicos, en particular, las variantes con perfiles de unión optimizados para la actividad mediada por FcγRIIb humano pueden mostrar una actividad superior en ratones CD32b transgénicos. Se pueden observar mejoras similares en la eficacia en ratones transgénicos para los otros receptores de Fc humanos, por ejemplo, FcγRIIa, FcγRI, etc., para moléculas de acoplamiento con perfiles de unión optimizados para los receptores respectivos. Los ratones transgénicos para receptores humanos múltiples mostrarían una actividad mejorada para las inmunoglobulinas con perfiles de enlace optimizados para los receptores múltiples correspondientes.

Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el uso de modelos animales para caracterizar la eficacia potencial de los anticuerpos terapéuticos candidatos en un paciente humano, algunos polipéptidos variantes descritos en el presente documento pueden encontrar utilidad como representantes para evaluar la eficacia potencial en humanos. Dichas moléculas representantes pueden imitar, en el sistema animal, la FcR y/o la biología del complemento de una inmunoglobulina humana candidata correspondiente. Es probable que este mimetismo se manifieste por afinidades de asociación relativas entre inmunoglobulinas específicas y receptores de animales frente a humanos. Por ejemplo, si uno estuviera usando un modelo de ratón para evaluar la eficacia potencial en humanos de una variante de Fc que tiene una afinidad reducida por el FcγRIIb humano inhibidor, una variante de proxy apropiada

tendría una afinidad reducida por el Fc $\gamma$ RII de ratón. También se debe tener en cuenta que las variantes de Fc de proxy podrían crearse en el contexto de una variante de Fc humana, una variante de Fc animal o ambas.

Adecuadamente, el ensayo de las moléculas de co-acoplamiento puede incluir el estudio de la eficacia en primates (por ejemplo, el modelo de mono cynomolgus) para facilitar la evaluación del agotamiento de células diana específicas que albergan el antígeno diana. Los modelos adicionales de primates incluyen, pero no se limitan a, el uso del mono rhesus para evaluar los polipéptidos Fc en estudios terapéuticos de autoinmunidad, trasplante y cáncer.

Se realizan estudios de toxicidad para determinar los efectos relacionados con el anticuerpo o la fusión con Fc que no pueden evaluarse en los perfiles de farmacología estándar, o que ocurren solo después de la administración repetida del agente. La mayoría de las pruebas de toxicidad se realizan en dos especies, un roedor y un no roedor, para garantizar que no se pasen por alto los efectos adversos inesperados antes de que se introduzcan nuevas entidades terapéuticas en el hombre. En general, estos modelos pueden medir una variedad de toxicidades que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductiva/del desarrollo y carcinogenicidad. Dentro de los parámetros mencionados anteriormente se incluyen la medición estándar del consumo de alimentos, el peso corporal, la formación de anticuerpos, la química clínica y el examen macro y microscópico de órganos/tejidos estándar (por ejemplo, cardiotoxicidad). Los parámetros adicionales de medición son el trauma en el lugar de la inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si corresponde. Tradicionalmente, las terapias con anticuerpos monoclonales, desnudos o conjugados, se evalúan para determinar la reactividad cruzada con tejidos normales, la inmunogenicidad/producción de anticuerpos, la toxicidad del conjugado o del enlazador y la toxicidad "indirecta" de las especies radiomarcadas. No obstante, es posible que dichos estudios deban individualizarse para abordar inquietudes específicas y seguir las pautas establecidas por ICH S6 (estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también mencionados anteriormente). Como tales, los principios generales son que los productos están suficientemente bien caracterizados, que se han eliminado las impurezas/contaminantes, que el material de prueba es comparable en todo el desarrollo, que se mantiene el cumplimiento de las normas GLP.

La farmacocinética (PK) de las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento puede estudiarse en una variedad de sistemas animales, siendo los más relevantes primates no humanos, como los monos cynomolgus y rhesus. Las administraciones i.v./s.c. únicas o repetidas en un intervalo de dosis de 6000 veces (0,05-300 mg/kg) pueden evaluarse para la vida media (días a semanas) utilizando la concentración plasmática y el aclaramiento. También se puede medir el volumen de distribución en un estado estable y el nivel de absorbancia sistémica. Los ejemplos de dichos parámetros de medición generalmente incluyen la concentración plasmática máxima observada (C<sub>max</sub>), el tiempo para alcanzar la C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>), el área bajo la curva de concentración de plasma en el tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito [AUC (0-inf)] y la eliminación aparente vida media (t<sub>1/2</sub>). Los parámetros adicionales medidos podrían incluir el análisis compartimental de los datos de concentración-tiempo obtenidos después de la administración iv y la biodisponibilidad.

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento pueden conferir una farmacocinética superior a las terapias que contienen Fc en sistemas animales o en seres humanos. Por ejemplo, una mayor unión a FcRn puede aumentar la vida media y la exposición del fármaco que contiene Fc. Alternativamente, la disminución de la unión a FcRn puede disminuir la vida media y la exposición del fármaco que contiene Fc en los casos en que la exposición reducida sea favorable, como cuando dicho fármaco tiene efectos secundarios.

Se sabe en la técnica que la matriz de receptores Fc se expresa diferencialmente en diversos tipos de células inmunitarias, así como en diferentes tejidos. La distribución diferencial en el tejido de los receptores Fc puede finalmente tener un impacto en las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento. Debido a que las moléculas de copigmento de la presentación tienen afinidades variables para la gama de receptores Fc, la selección adicional de los polipéptidos para las propiedades de PD y/o PK puede ser extremadamente útil para definir el equilibrio óptimo de PD, PK y la eficacia terapéutica conferida por cada polipéptido candidato.

Los estudios farmacodinámicos pueden incluir, pero no se limitan a, apuntar a células específicas o bloquear mecanismos de señalización, medir la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno, etc. Las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento pueden apuntar a poblaciones de células efectoras particulares y, por lo tanto, dirigir a los fármacos que contienen Fc para inducir ciertas actividades para mejorar la potencia o para aumentar la penetración en un compartimento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad de los neutrófilos y la localización pueden ser dirigidas por una molécula de co-acoplamiento que se dirige a Fc $\gamma$ RIIIb. Dichos efectos farmacodinámicos pueden demostrarse en modelos animales o en seres humanos.

#### Uso

Una vez hechas, las moléculas de co-acoplamiento como se describen aquí encuentran uso en una variedad de métodos. En una realización preferida, el método incluye poner en contacto una célula que coexpresa IgE y Fc $\gamma$ RIIb con una molécula de co-acoplamiento de manera que tanto la IgE como el Fc $\gamma$ RIIb están unidos por la molécula de co-acoplamiento y la célula se inhibe. Por "inhibido" en este contexto se entiende que la molécula de co-acoplamiento previene o reduce la activación y/o proliferación de las células B de IgE+.

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden encontrar uso en una amplia gama de productos. En una realización, una molécula de co-acoplamiento descrita en este documento es un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación. Las moléculas de co-acoplamiento pueden encontrar uso en una composición que es monoclonal o policlonal. Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden usarse con fines terapéuticos. Como apreciarán los expertos en la técnica, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento se pueden usar para cualquier fin terapéutico para el que se puedan usar los anticuerpos, y similares. Las moléculas de co-acoplamiento pueden administrarse a un paciente para tratar trastornos que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades infecciosas y cáncer.

Un "paciente" para los fines descritos en este documento incluye tanto seres humanos como otros animales, por ejemplo, otros mamíferos. Por lo tanto, las moléculas de co-acoplamiento descritas en este documento tienen aplicaciones tanto de terapia humana como de veterinaria. El término "tratamiento" o "tratamiento" como se describe en el presente documento pretende incluir el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o supresivas para una enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, la administración exitosa de una molécula de co-acoplamiento antes de la aparición de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de una molécula de co-acoplamiento optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratamiento" también incluyen la administración de una inmunoglobulina optimizada después de la aparición de la enfermedad para erradicarla. La administración exitosa de un agente después del inicio y después de que se hayan desarrollado los síntomas clínicos, con la posible reducción de los síntomas clínicos y quizás la mejoría de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos que "necesitan tratamiento" incluyen mamíferos que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno, incluidos aquellos en los cuales se debe prevenir la enfermedad o trastorno.

En una realización, una molécula de co-acoplamiento descrita en este documento se administra a un paciente que tiene una enfermedad que implica la expresión inapropiada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance descrito en el presente documento, se pretende que incluya enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas anormales, debido, por ejemplo, a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, localización de proteínas, modificación postraduccional, estado conformacional, la presencia de una proteína mutante o patógena, etc. De manera similar, la enfermedad o trastorno puede caracterizarse por moléculas de alteración que incluyen, pero no se limitan a, polisacáridos y gangliósidos. Una sobreabundancia puede deberse a cualquier causa, que incluye, pero no se limita a, la sobreexpresión a nivel molecular, la aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción o el aumento de la actividad de una proteína en relación con lo normal. Se incluyen dentro de esta definición las enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción de una proteína. Esta reducción puede deberse a cualquier causa, que incluye, pero no se limita a, la expresión reducida en el nivel molecular, la aparición reducida o reducida en el sitio de acción, las formas mutantes de una proteína o la actividad reducida de una proteína en relación con la normal. Dicha sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse en relación con la expresión, apariencia o actividad normal de una proteína, y dicha medición puede jugar un papel importante en el desarrollo y/o ensayo clínico de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento.

En el presente documento se describen nuevos métodos para tratar trastornos mediados por IgE, por ejemplo, alergias alimentarias y ambientales y asma alérgica. En realizaciones preferidas, las enfermedades alérgicas que pueden tratarse con los productos y métodos de la invención incluyen asma alérgica y atópico, dermatitis atópica y eczema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomielitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica y anafiláctica. Las alergias ambientales y alimentarias que pueden tratarse incluyen alergias a la marmita del polvo, cucarachas, gatos y otros animales, polen (incluyendo la ambrosía, el pasto de las Bermudas, el cardo ruso, el roble, el centeno y otros), mohos y hongos (por ejemplo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* y otros), látex, picaduras de insectos (abeja, avispa y otros), penicilina y otros fármacos, fresas y otras frutas y verduras, cacahuets, soja y otras legumbres, nueces y otros frutos secos, mariscos y otros mariscos, leche y otros productos lácteos, trigo y otros granos, y huevos. De hecho, cualquier alérgeno alimentario, aeroalérgico, alérgeno ocupacional u otro alérgeno ambiental mediado por IgE puede tratarse con una cantidad terapéutica de los productos descritos en esta invención. Para obtener ejemplos de alérgenos comunes, véase Arbes et al., Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, *Clinical Gastroenterology* 116(2), 377-383 (2005).

También se describen pruebas de diagnóstico para identificar a los pacientes que probablemente muestren una respuesta clínica favorable a una molécula de co-acoplamiento descrita en el presente documento, o que probablemente muestren una respuesta significativamente mejor cuando se trate con una molécula de co-acoplamiento descrita en este documento en comparación con uno o más productos terapéuticos utilizados actualmente. Se puede usar cualquiera de una serie de métodos para determinar polimorfismos de FcγR en seres humanos conocidos en la técnica. Además, también se describen las pruebas de pronóstico realizadas en muestras clínicas, tales como muestras de sangre y tejidos. Dichas pruebas pueden evaluar la actividad, independientemente del mecanismo. Dicha información se puede usar para identificar a los pacientes para su inclusión o exclusión en ensayos clínicos, o para informar las decisiones con respecto a las dosis apropiadas y los tratamientos de rutina. Dicha información también se puede usar para seleccionar un fármaco que contenga una molécula de co-acoplamiento particular que muestre una actividad superior en dicho ensayo.

## Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan una molécula de co-acoplamiento descrita en el presente documento y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento se preparan para el almacenamiento mezclando dicha inmunoglobulina que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butilbencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; rellenos tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sal, como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Adecuadamente, la composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina descrita en el presente documento puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, que significa que incluye tanto sales de adición de ácido como de base. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otra manera indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Algunos casos incluyen al menos una de las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas naturales sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un liposoma es una pequeña vesícula que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la inmunoglobulina se preparan por métodos conocidos en la técnica. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extraen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

La molécula de co-acoplamiento y otros agentes terapéuticamente activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen, pero no se limitan a, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, utilizando hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli(metilmetacrilato)), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en la 16ª edición de Remington's Pharmaceutical Sciences, Osol, A. Ed., 1980. Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímero hidrófobo sólido, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno no degradable, acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico-glicólico degradables como el Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico, y ProLease® (disponible comercialmente en Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto por la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicolida (PLG).

## Administración

La administración de la composición farmacéutica que comprende una molécula de co-acoplamiento descrita en el presente documento, por ejemplo, en forma de una disolución acuosa estéril, puede realizarse de varias maneras, que incluyen, pero no se limitan a, la administración oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, por

vía tópica (p. ej., geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas, inflamaciones, etc., la inmunoglobulina se puede aplicar directamente como una disolución o aerosol. Como se conoce en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse de acuerdo con la forma de introducción.

- 5 La administración subcutánea se puede usar en circunstancias en las que el paciente puede autoadministrarse la composición farmacéutica. Muchas terapias con proteínas no son lo suficientemente potentes para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente eficaz en el volumen máximo aceptable para la administración subcutánea. Este problema puede abordarse en parte por el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser más susceptibles de  
10 administración subcutánea debido, por ejemplo, a un aumento de la potencia, a una vida media en suero mejorada o a una mayor solubilidad.

Como se conoce en la técnica, las terapias de proteínas a menudo se administran mediante infusión IV o bolos. Los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden administrarse usando dichos métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con cloruro de sodio al 0,9% como un vehículo de infusión.

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

- 25 Además, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden ser más susceptibles de administración oral debido, por ejemplo, a una estabilidad mejorada a pH gástrico y a una mayor resistencia a la proteólisis. Además, el FcRn parece expresarse en el epitelio intestinal de los adultos, por lo que los anticuerpos descritos en el presente documento con perfiles de interacción de FcRn mejorados pueden mostrar una mayor biodisponibilidad después de la administración oral. El transporte de anticuerpos mediado por FcRn también puede  
30 ocurrir en otras membranas mucosas, como las de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genital.

- Además, cualquiera de una serie de sistemas de administración son conocidos en la técnica y pueden usarse para administrar los anticuerpos descritos en el presente documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (por ejemplo, microesferas de PLA/PGA), y similares. Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas  
35 o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o matriz tal como poliésteres, hidrogeles, poli (alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-gutamato, acetato de etileno-vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como Lupron Depot® y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina descrita en el presente documento, por ejemplo, por infección retroviral, inyección directa o recubrimiento con lípidos, receptores de la superficie celular u otros agentes de transfección. En todos los casos, se pueden usar sistemas de liberación controlada para liberar la  
40 inmunoglobulina en o cerca de la ubicación de acción deseada.

#### Dosificación

- Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración, en un caso, se seleccionan para ser terapéutica o profilácticamente eficaz. Como se conoce en la técnica, los ajustes para la degradación de proteínas, la administración  
45 sistémica frente a la localizada y la velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción farmacológica y la gravedad de la condición puede ser necesaria y se podrá determinar con experimentación rutinaria por parte de los expertos en la materia.

- La concentración de la molécula de co-acoplamiento terapéuticamente activa en la formulación puede variar de  
50 aproximadamente 0,1 a 100% en peso. Adecuadamente, la concentración de la molécula de co-acoplamiento está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Con el fin de tratar a un paciente, puede administrarse una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina descrita en el presente documento. Por "dosis terapéuticamente eficaz" en el presente documento se entiende una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y un experto en la técnica la podrá determinar utilizando técnicas conocidas. Las dosis pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo, 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal.  
55 En un caso, las dosis varían entre 1 y 10 mg/kg.

Adecuadamente, solo se usa una dosis única de la molécula de co-acoplamiento. En otros casos, se administran dosis múltiples de la molécula de co-acoplamiento. El tiempo transcurrido entre las administraciones puede ser menos de 1

hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas o más de 2 semanas.

5 Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Dicha administración metronómica puede implicar la dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Por lo general, estos regímenes abarcan la infusión crónica de dosis baja o continua durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo, 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses, o hasta 6 meses o más. El uso de dosis más  
10 bajas puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de descanso.

Adecuadamente, las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. La terapia de ciclismo implica la administración de un primer agente a la vez, un segundo agente a la segunda, agentes opcionales adicionales en tiempos adicionales, opcionalmente un período de descanso y después repetir esta secuencia de administración una o más veces. El  
15 número de ciclos es típicamente de 2 a 10. La terapia de ciclos puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

#### Terapias de combinación

Las moléculas de co-acoplamiento descritas en el presente documento pueden administrarse concomitantemente con uno o más regímenes o agentes terapéuticos. Se pueden usar regímenes o agentes terapéuticos adicionales para  
20 tratar la misma enfermedad, para tratar una complicación acompañante, o se pueden usar para mejorar la eficacia o seguridad de la inmunoglobulina

Las co-terapias particularmente preferidas incluyen aquellas que están aprobadas o que están siendo evaluadas clínicamente para el tratamiento de trastornos mediados por IgE, como alergias y asma. En particular, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden usar en combinación con antiinflamatorios como los  
25 corticosteroides y/o broncodilatadores como los agonistas  $\beta_2$  inhalados, los dos grupos principales de medicamentos. Los corticosteroides inhalados incluyen fluticasona, budesonida, flunisolida, mometasona, triamcinolona y beclometasona, mientras que los corticosteroides orales incluyen prednisona, metilprednisolona y prednisolona. Otros esteroides incluyen glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, azulfidineaicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, así como esteroides tópicos como antralina, calcipotrieno, clobetasol y tazaroteno. Los broncodilatadores aumentan el diámetro de las vías respiratorias y facilitan el flujo hacia y desde los  
30 pulmones. Los broncodilatadores que pueden combinarse con las terapias de la invención incluyen broncodilatadores de acción corta como metaproterenol, efedrina, terbutalina y albuterol, y broncodilatadores de acción prolongada como salmeterol, metaproterenol y teofilina.

Las terapias de la invención pueden combinarse con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, ketoralac, oxaprozina, nabumentona, sulindac, tolmentina, refecoxib, naproxeno, ketoprofeno y nabumetona. Las terapias conjuntas pueden incluir  
35 antihistamínicos como loratadina, fexofenadina, cetirizina, difenhidramina, maleato de clorfeniramina, clemastina y azelastina. La co-terapia puede incluir cromoglicato, cromolina sódica y nedrocromilo, así como descongestionantes, en spray u orales, como la oximetazolina, fenilefrina y pseudoefedrina. Las terapias de la invención pueden combinarse con una clase de antiinflamatorios denominados antagonistas de los receptores de leucotrienos, tales como pranlukast, zafirlukast y montelukast, e inhibidores de la síntesis de los receptores de leucotrienos, como el zileutón.

Las terapias de la invención pueden combinarse con otras inmunoterapias, que incluyen inyecciones para alergias, así como otros antagonistas de IgE o Fc $\epsilon$ R $\epsilon$ s. Las terapias de la invención pueden combinarse con antagonistas de quimiocinas o citoquinas, incluidos, entre otros, anticuerpos y fusiones de Fc, que incluyen, pero no se limitan a,  
45 inhibidores de las quimiocinas CCR3, CCR4, CCR8 y CRTH2 y CCR5, e inhibidores de las citoquinas IL -13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-21, familia de receptores de citoquinas de Clase II, IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31 e IL-33. Las terapias de la invención pueden combinarse con moduladores de adhesión, factores de transcripción y/o señalización intracelular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la invención se pueden combinar con moduladores de NF-kb, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFAT, supresores de la señalización de citoquinas (SOCS), receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR), quinasa MAP, p38 MAPK, JNK y receptores de I-fosfato de esfingosina. Las terapias de la invención se pueden administrar con tolitato suplatast, inhibidores de la fosfodiesterasa 4 (PDE4), bloqueadores de los canales de calcio y moléculas similares a la heparina. Las posibles co-terapias para la invención se describen con más detalle en Caramori et al., 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3-S1-S6.

55 Las terapias de la invención también pueden usarse junto con uno o más antibióticos, agentes antifúngicos o agentes antivirales. Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden combinar con otros regímenes terapéuticos, como la cirugía.

Los ejemplos que se proporcionan a continuación son solo para fines ilustrativos. Estos ejemplos no pretenden

restringir ninguna realización descrita en este documento a ninguna aplicación particular o teoría de operación.

#### Ejemplo 1. Nuevos métodos para inhibir las células IgE+ FcγRIIb+

La inmunoglobulina IgE es un iniciador central y propagador de la respuesta alérgica en el tejido afectado. La IgE se une al receptor de alta afinidad por la IgE (FcεRI), un receptor clave involucrado en las manifestaciones alérgicas inmediatas que se expresa en una variedad de células efectoras, incluidos los mastocitos, basófilos, eosinófilos, así como otros tipos de células. La reticulación de FcεRI por el alérgeno de IgE inmunocomplejado activa estas células, liberando mediadores químicos como la histamina, las prostaglandinas y los leucotrienos, que pueden conducir al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo I. El anticuerpo monoclonal aprobado Omalizumab (Xolair) neutraliza la IgE al unirse a ella y bloquear el contacto con los FcεR. Omalizumab reduce la IgE bioactiva mediante el secuestro, atenuando la cantidad de IgE específica de antígeno que puede unirse y sensibilizar a los mastocitos y basófilos tisulares. Esta neutralización de la IgE circulante libre, a su vez, conduce a una disminución de los síntomas de las enfermedades alérgicas. Curiosamente, los niveles séricos de IgE aumentan después del inicio de la terapia debido a la formación del complejo omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de interrumpir la terapia. En consecuencia, este problema puede llevar a falsos negativos en las pruebas de diagnóstico y, por lo tanto, los niveles de IgE deben verificarse de forma rutinaria.

Un nuevo enfoque para apuntar a la vía de la IgE implica no solo bloquear a la IgE circulante libre para que no se enganche a los FcεR en las células efectoras, sino también a la fuente de producción de IgE. La IgE es secretada por células plasmáticas productoras de IgE ubicadas en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de entrada de antígeno o localmente en los sitios de reacciones alérgicas. Las células plasmáticas productoras de IgE se diferencian de las células B IgE+. El cambio de clase de las células B a la producción de IgE es inducido por dos señales separadas, las cuales pueden ser proporcionadas por las células TH2.

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

Las células B diferenciadas que expresan IgE anclada a la membrana, que aquí se hace referencia a las células B mIgE+, poseen un mecanismo de retroalimentación que regula de manera negativa: el receptor inhibitorio de FcγRIIb. FcγRIIb se expresa en una variedad de células inmunes, incluidas células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, donde desempeña un papel fundamental en la regulación inmunológica. En su papel normal en las células B, FcγRIIb sirve como un mecanismo de retroalimentación para modular la activación de las células B a través del receptor de células B (BCR). El compromiso de BCR por el antígeno complejo inmune en células B maduras activa una cascada de señalización intracelular, que incluye la movilización de calcio, lo que conduce a la proliferación y diferenciación celular. Sin embargo, a medida que se producen anticuerpos IgG con especificidad para el antígeno, los complejos inmunes asociados (IC) pueden reticular el BCR con FcγRIIb, con lo que la activación de BCR se inhibe por el acoplamiento de FcγRIIb y las vías de señalización intracelular asociadas que interfieren con las vías descendentes de activación de BCR. La expresión de FcγRIIb en la superficie de las células mIgE+ B, que utilizan mIgE como su BCR, sirve como un regulador negativo de estos tipos de células.

Una nueva estrategia para inhibir la enfermedad mediada por IgE, ilustrada en la Figura 1, es inhibir las células B de IgE+ (es decir, las células B que expresan la IgE anclada en la membrana) mediante la unión de la IgE anclada en la membrana y el receptor inhibitorio FcγRIIb. En las células B que han cambiado de clase para expresar IgE, mIgE sirve como BCR (referido aquí como mIgE BCR). Este enfoque podría imitar potencialmente el mecanismo biológico natural de la supresión mediada por complejos inmunes de la activación de las células B, evitando así la diferenciación en células plasmáticas productoras de IgE. Las células plasmáticas productoras de IgE residen en la médula ósea y probablemente tengan una vida útil de varias semanas a varios meses. Dado que las nuevas células plasmáticas secretoras de IgE atraviesan los estadios de las células B que expresan mIgE durante la diferenciación, si su generación se anula al inhibir sus precursores de células mIgE+ B con este tratamiento anti-IgE, las células plasmáticas existentes morirán en cuestión de semanas o meses, y así la producción de IgE también disminuirá gradualmente. Es importante destacar que la inhibición de las células B de memoria IgE+, que llevan mIgE, también se inhibiría por las inmunoglobulinas anti-IgE que co-acoplan FcγRIIb con alta afinidad. Si esto ocurre, la terapia puede tener un impacto a largo plazo en la enfermedad fundamental.

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

En condiciones fisiológicas, el puente del BCR con FcγRIIb y la supresión de células B subsiguientes se produce a través de complejos inmunes de IgG y antígeno relacionado. La estrategia de diseño fue reproducir este efecto utilizando un único anticuerpo de reticulación. La IgG humana se une a FcγRIIb humano con afinidad débil (mayor que 100 nM para IgG1), y la inhibición mediada por FcγRIIb se produce en respuesta a IgG inmunocomplejada pero no monomérica. Se razonó que se requeriría una alta afinidad con este receptor (inferior a 100 nM) para la inhibición máxima de la activación de las células B. Para potenciar la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE de la invención, la región Fc se diseñó con variantes que mejoran la unión a FcγRIIb. Se han descrito variantes de Fc

diseñadas que se unen a FcγRIIb con afinidad mejorada en relación con la IgG1 nativa (USSN 12/156,183 (US 2009-0136485 A1), presentada el 30 de mayo de 2008, titulada "Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing cells").

5 Las variantes se generaron originalmente en el contexto de un anticuerpo dirigido al antígeno CD19, un componente regulador del complejo correceptor BCR. La región Fv de este anticuerpo es una versión humanizada y de afinidad madura del anticuerpo 4G7, y se menciona aquí como HuAM4G7. Los genes Fv para este anticuerpo se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 (National Research Council Canada). Las mutaciones en el dominio Fc se introdujeron utilizando mutagénesis dirigida al sitio (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, TX). Además, se generaron variantes de control eliminadas con afinidad ablacionada para los receptores Fc que comprenden las sustituciones G236R y L328R (G236R/L328R). Esta variante se conoce como Fc-KO o Fc knockout. Las construcciones de cadena pesada y ligera se cotransfectaron en células HEK293E para la expresión, y los anticuerpos se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

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

20 Las variantes se probaron para determinar la afinidad del receptor utilizando la tecnología Biacore, también denominada Biacore en el presente documento, una tecnología basada en resonancia de plasmón de superficie (SPR) para estudiar las interacciones biomoleculares en tiempo real. Las mediciones de SPR se realizaron utilizando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se generó un chip biosensor CM5 de proteína A/G (Pierce Biotechnology) (Biacore) utilizando un protocolo estándar de acoplamiento de aminas primarias. Todas las mediciones se realizaron utilizando un tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, 0,005% vol/vol de tensoactivo P20, Biacore). Se inmovilizaron anticuerpos a 20 nM o 50 nM en tampón HBS-EP sobre la superficie de la proteína A/G y se inyectaron FcγRs. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró inyectando tampón de glicina (10 mM, pH 1,5). Los datos se procesaron mediante el tiempo de puesta a cero y la respuesta antes de la inyección de FcγR y restando las señales inespecíficas apropiadas (respuesta del canal de referencia e inyección del tampón de funcionamiento). Los análisis cinéticos se realizaron mediante el ajuste global de los datos de enlace con un modelo de enlace Langmuir 1: 1 utilizando el software de evaluación BIAore (Biacore).

25 En la Figura 2 se muestra un conjunto representativo de sensogramas para la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes seleccionados a FcγRIIb. Las afinidades de todas las variantes y WT (nativo) IgG1 a todos los FcγR, obtenidos a partir de los ajustes de los datos de unión de Biacore, se representan en la Figura 3 y se proporcionan numéricamente en la Figura 4. Mientras que WT IgG1 Fc se une con FcγRIIb con afinidad mM ( $K_D = 1,8 \mu\text{M}$  en la Figura 4), varias variantes, por ejemplo G236D/S267E, S239D/S267E y S267E/L328F, se han diseñado para unir más el receptor inhibitorio herméticamente. La variante S239D/I332E, como se describe en USSN 11/124,620 (US 2006-0024298 A1), también tiene una afinidad mejorada por los receptores activadores FcγRIIa y FcγRIIIa, y por lo tanto es capaz de una citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis (ADCP). La variante G236R/L328R, también denominada Fc-knockout o Fc-KO, carece de enlace con los receptores Fc, y se usa como control en los experimentos descritos en este documento.

35 Se construyeron variantes selectas en anticuerpos que se dirigen a la IgE. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera (VH y VL) de los anticuerpos anti-IgE se proporcionan en la Figura 5. Omalizumab es un anticuerpo humanizado actualmente aprobado para el tratamiento del asma alérgica, y se comercializa con el nombre de Xolair. MaE11 es el precursor murino de omalizumab. H1L1\_MaE11 es una nueva versión humanizada de MaE11. Los genes que codifican los dominios VH y VL pesados y ligeros de estos anticuerpos anti-IgE se sintetizaron comercialmente (Blue Heron Biotechnologies). También se sintetizaron los genes de la región variable VH y VL del motavizumab del anticuerpo anti-virus respiratorio sincitial (RSV), utilizado en los experimentos descritos aquí como un control negativo. Los genes VL se subclonaron en el vector de expresión de mamíferos pTT5 (NRC-BRI, Canadá) que codifica la cadena constante de Ckappa. Los genes VH se subclonaron en el vector pTT5 que codifica las cadenas de IgG1 nativas y constantes variantes. Las secuencias de aminoácidos de cadenas constantes seleccionadas se proporcionan en la Figura 6. Todo el ADN fue secuenciado para confirmar la fidelidad de las secuencias. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de longitud completa de los anticuerpos seleccionados se proporcionan en la Figura 7.

40 Los plásmidos que contenían genes de cadenas pesadas y ligeras se cotransfectaron en células HEK293E utilizando lipofectamina (Invitrogen) y se cultivaron en medios FreeStyle 293 (Invitrogen). Después de 5 días de crecimiento, los anticuerpos se purificaron del sobrenadante del cultivo por afinidad con la proteína A utilizando resina MabSelect (GE Healthcare).

45 Se probaron anticuerpos IgG1 anti-IgE nativos y variantes para unirse a IgE y a FcγRIIb usando Biacore. El ADN que codifica la región Fc de IgE, que contiene el sitio de unión para los anticuerpos anti-IgE utilizados, se sintetizó (Blue Heron Biotechnologies) y se subclonó en el vector pTT5. La IgE Fc se expresó en células 293E y se purificó usando proteína A como se describe anteriormente. Las mediciones de SPR se realizaron utilizando el método de captura de

proteína A/anticuerpo descrito anteriormente, excepto que el analito fue FcγRIIb o la región Fc de IgE. La adquisición de datos y el ajuste son como se describe anteriormente. La Figura 8 proporciona las constantes de unión de equilibrio ( $K_D$ ) resultantes obtenidas de estos experimentos de unión, así como la afinidad de veces en relación con la IgG1 nativa para la unión a FcγRIIb. La figura 9 muestra gráficos de estos datos. Los resultados confirman la alta afinidad de los anticuerpos para IgE, y que la variante S267E/L328F mejora la unión a FcγRIIb en dos órdenes de magnitud, consistente con los resultados anteriores.

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

Las combinaciones no limitantes de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen: 234/239, 234/267, 234/328, 235/236, 235/239, 235/267, 235/268, 235/328, 236/239, 236/267, 236/268, 236/328, 237/267, 239/267, 239/268, 239/327, 239/328, 239/332, 266/267, 267/268, 267/325, 267/327, 267/328, 267/332, 268/327, 268/328, 268/332, 326/328, 327/328 y 328/332. Adecuadamente, las combinaciones de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268 y 267/328.

Las sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen: 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E. Adecuadamente, la combinación de posiciones para hacer sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluye, pero no se limita a: 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y.

Las combinaciones de sustituciones para mejorar la afinidad con FcγRIIb incluyen: L234D/S267E, L234E/S267E, L234F/S267E, L234E/L328F, L234W/S239D, L234W/S239E, L234W/S267E, L234W/L328Y, L235D/S267E, L235D/L328F, L235F/S239D, L235F/S267E, L235F/L328Y, L235Y/G236D, L235Y/S239D, L235Y/S267D, L235Y/S267E, L235Y/H268E, L235Y/L328F, G236D/S239D, G236D/S267E, G236D/H268E, G236D/L328F, G236N/S267E, G237D/S267E, G237N/S267E, S239D/S267D, S239D/S267E, S239D/H268D, S239D/H268E, S239D/A327D, S239D/L328F, S239D/L328W, S239D/L328Y, S239D/I332E, S239E/S267E, V266M/S267E, S267D/H268E, S267E/H268D, S267E/H268E, S267E/N325L, S267E/A327D, S267E/A327E, S267E/L328F, S267E/L328I, S267E/L328Y, S267E/I332E, H268D/A327D, H268D/L328F, H268D/L328W, H268D/L328Y, H268D/I332E, H268E/L328F, H268E/L328Y, A327D/L328Y, L328F/I332E, L328W/I332E, y L328Y/I332E. Adecuadamente, las combinaciones de sustituciones para mejorar la afinidad por FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a: L235Y/S267E, G236D/S267E, S239D/H268D, S239D/S267E, S267E/H268D, S267E/H268E, y S267E/L328F.

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

Se estableció un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar la IgE. Las placas de fondo plano se prepararon recubriendo con pH 9,4 de tampón de bicarbonato, seguido de adherencia con anticuerpos de captura anti-IgE a 10 ug/ml durante toda noche en pH 9,4 (0,1 M de tampón de bicarbonato). Después de toda la noche, la placa se bloqueó con BSA al 3%/PBS, y se agregaron diluciones en serie de IgE (de un kit ELISA de IgE humana, Bethyl Laboratories) 3x a 1 ug/ml. Después de 3 horas, las placas se lavaron 3x (200 ul) con TTBS, y se midió la IgE unida. Se añadió anticuerpo anti-IgE humano policlonal de cabra conjugado con HRP (Bethyl Laboratories) a (1:5000) durante 1 hora en BSA/ PBS al 1%. Las muestras se lavaron 3x y se detectó IgE con sustrato de peroxidasa TMB (KPL, Inc 50-76-00). Las reacciones se detuvieron con 50 ul 2N H2SO4 y se leyeron a 450 nm.

La Figura 10 muestra la captura de IgE con varios anticuerpos anti-IgE humanos, que incluyen un conjunto de tres anticuerpos monoclonales anti-IgE (MabTech; 107/182/101), MaE11\_IgG1\_G236R/L328R, y Omalizumab\_IgG1\_G236R/L328R. Los datos muestran que el reactivo de anticuerpo anti-IgE comercial (MabTech), Omalizumab y su anticuerpo quimérico primario MaE11 son capaces de capturar IgE. Para utilizar este ensayo para detectar IgE, fue necesario determinar si los anticuerpos MaE11 y omalizumab interferirían con la captura de IgE por el reactivo anti-IgE de MabTech. El ensayo se repitió como se describe anteriormente, y la concentración de IgE de la absorbancia se calculó utilizando una curva estándar. La Figura 11 muestra que el anticuerpo anti-IgE omalizumab\_G236R/L328R no compite con el anticuerpo MabTech anti-IgE en el protocolo ELISA actual.

Los anticuerpos anti-IgE de la variante de Fc se probaron para determinar su capacidad para inhibir las células B IgE+. Las PBMC humanas se indujeron a cambiar de clase a células B productoras de IgE mediante la adición de 5 ng/ml de interleucina 4 (IL-4) y 100 ng/ml de anticuerpo anti-CD40 (clon G28.5 IgG1). El anticuerpo anti-CD40 es un agonista de CD40 y, por lo tanto, imita la actividad del coactivador CD40L. Se agregaron concentraciones variables de anticuerpos anti-IgE y las muestras se incubaron durante 12 días. Las placas de ELISA se prepararon y bloquearon como se describió anteriormente, utilizando 5 ug/ml de Mabtech anti-IgE como el anticuerpo de captura. Se agregaron 100 ul de las muestras de PBMC y se incubaron >3 horas, y después se lavaron con TTBS 3x (200 ul). El anticuerpo conjugado anticuerpo-HRP se añadió y detectó como se describe anteriormente. La absorbancia a 450 nm se convirtió

en concentración de IgE utilizando una curva estándar. Los resultados se muestran en la Figura 12. Los anticuerpos que carecen de la unión de FcγR (variantes G236R/L328R) o que no tienen especificidad para IgE (anticuerpo anti-RSV de Motavizumab) no tuvieron efecto sobre la producción de IgE a partir de células B diferenciadas. En contraste, los anticuerpos variantes con mayor afinidad por FcγRIIb inhibieron la producción de IgE. Estos datos sugieren que el co-acoplamiento de la IgE de superficie y el receptor inhibitorio de FcγR FcγRIIb inhibe las células B de clase conmutada de ese tipo de inmunoglobulina. La inhibición de las células B de IgE+ reduce el número de células plasmáticas que expresan IgE, lo que a su vez reduce la cantidad de IgE detectada. Para evaluar la selectividad de esta actividad para las células B productoras de IgE, se midió la IgG2 humana a partir de las mismas muestras utilizando un ELISA de IgG2 (Bethyl Laboratories). La Figura 13 muestra que la secreción de IgG2 no se inhibió, lo que indica que la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb es selectiva para las células con cambio de clase IgE+. La repetición de este experimento utilizando versiones variantes del anticuerpo anti-IgE aprobado Omalizumab mostró resultados inhibitorios similares por la variante con alta afinidad por FcγRIIb (Figura 14).

La capacidad de los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb para inhibir la producción de IgE se evaluó en presencia de la estimulación de mIgE BCR. Se repitió el ensayo anterior, con el cambio de clase a IgE promovida por IL-4 y el anticuerpo agonista α-CD40, y además las células B se activaron utilizando anticuerpos anti-μ o anti-CD79b. Estos anticuerpos entrecruzan el BCR, proporcionando así una señal similar a un antígeno inmunocomplejado. El anticuerpo anti-μ reticula la IgM anclada a la membrana y el anti-CD79b reticula el CD79b, que es un componente de señalización del complejo BCR. Las PBMC se incubaron durante 14 días con IL-4, α-CD40 y anti-CD79b o anti-μ, y se detectó IgE como se describió anteriormente. Los resultados para anti-CD79b (Figura 15) y anti-μ (Figura 16) muestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb son capaces de inhibir la producción de IgE cuando las células B se estimulan mediante la reticulación de BCR.

Una estrategia adicional para inhibir las células B de IgE+ es agotarlos. Esto se puede llevar a cabo utilizando un anticuerpo anti-IgE que está mejorado para la función efectora. La variante S239D/I332E aumenta la unión al receptor de activación FcγRIIa y FcγRIIIa (Figura 3 y Figura 4), y por lo tanto mejora las funciones de los efectores de ADCC y ADCP. El ensayo de células B anterior se llevó a cabo utilizando una variante S239D/I332E del anticuerpo anti-IgE Omalizumab. Las PBMC se incubaron durante 14 días con IL-4, α-CD40 y anti-CD79b (Figura 17) o anti-μ (Figura 18), y se detectó IgE como se describió anteriormente. Los resultados (Figuras 17 y 18) muestran que los anticuerpos anti-IgE con función efectora optimizada son capaces de inhibir la producción de IgE a partir de células B de IgE+ de clase conmutada.

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

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

Los donantes de sangre se examinaron en busca de alergia al antígeno del ácaro del polvo en función de la presencia de anticuerpos anti-IgE contra Der p 1. Un donante con reactividad positiva fue sometido a leucafonía para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El protocolo para el estudio se proporciona en la Figura 20. Un día antes de la inyección de PBMC, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) con 100 μl de anticuerpo GM anti-asialo (Wako, Richmond, VA) para agotar las células asesinas naturales (NK) murinas. Al día siguiente, a los ratones se les inyectó i.p. con  $3 \times 10^7$  de PBL en un volumen de 0,5 ml. Después de la inyección de PBMC, los ratones se asignaron a 5 grupos diferentes de ratones con 7 ratones en cada grupo. En el día 7 después de la inyección de PBMC, se extrajo sangre de todos los ratones mediante punción de seno/plexo retro-orbital (OSP) para la determinación de los niveles de IgG e IgE humana mediante ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dos días después (día 9), los ratones se inyectaron i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. En el día 11, los ratones se inyectaron i.p. con 15 μg de antígeno de ácaro del polvo, Der p 1 (LoTox Natural Der p 1, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA). En el día 23 (12 días después de la vacunación con antígeno), se recogió sangre de todos los ratones para la determinación de anticuerpos IgG e IgE humanos. El mismo día, los ratones recibieron una segunda inyección i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. Dos días después (día 25), los ratones recibieron una vacuna de vacunación de refuerzo de 10 μg de antígeno de ácaro del polvo, Der p 1. En el día 37 (12 días después del refuerzo de antígeno), se recogió sangre mediante OSP para la determinación de inmunoglobulina humana. Las concentraciones de IgG e IgE humanas se midieron utilizando métodos ELISA similares a los descritos anteriormente.

Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21 para los niveles séricos de IgG e IgE, respectivamente. Antes de la exposición al alérgeno, los niveles de anticuerpos IgG e IgE humanos eran bajos en todos los grupos. Después de la inmunización con Der p 1, todos los grupos mostraron niveles altos de IgG humana, lo que indica una respuesta inmune robusta por parte de células B humanas injertadas contra el antígeno Der p 1 vacunado o antígenos de ratón endógenos. En contraste con la respuesta de IgG, los grupos de tratamiento difirieron significativamente en su producción de anticuerpos IgE. Omalizumab y la versión de IgG1 de H1L1 MaE11 fueron equivalentes a los vehículos

- 5 en su capacidad de inhibir la producción de IgE humana. Sin embargo, la versión mejorada con FcγRIIb (IIbE, S267E/L328F) de H1L1 MaE11 no mostró niveles detectables de IgE humana. La versión Fc-KO (variante G236R/L328R) de H1L1 MaE11, que carece de unión a todos los FcγRs, mostró una mejora en la producción de IgE humana. Esto se debe posiblemente a su capacidad para reticular mIgE humana y, por lo tanto, activar las células B IgE+, pero su completa falta de actividades inhibitorias de FcγRIIb o FcγRIIIa/IIIa, como las que poseen las versiones IgG1 e IIbE del anticuerpo. Estos datos in vivo muestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb son capaces de inhibir la activación de células B de IgE+ humanas y la diferenciación de células plasmáticas secretoras de inmunoglobulina, y por lo tanto apoyan el potencial de las inmunoglobulinas descritas en el presente documento para tratar los trastornos mediados por IgE.
- 10 La descripción incluye además el objeto de las reivindicaciones del documento WO2010/033736 del que se deriva esta solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como párrafos numerados.
- 15 **Párrafo 1.** Un método para inhibir una célula de IgE+ FcγRIIb+ que comprende poner en contacto la célula con una molécula de co-acoplamiento, en donde dicha molécula de co-acoplamiento se une a FcγRIIb con una Kd de menos de aproximadamente 100 nM, y en el que dicha molécula de co-acoplamiento establece la unión de IgE y FcγRIIb en la superficie de la célula.
- Párrafo 2.** El método del párrafo 1, en donde dicha molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo con especificidad para IgE.
- 20 **Párrafo 3.** El método del párrafo 1, en donde la molécula de co-acoplamiento es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en donde dicha primera región Fv se une a IgE y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.
- Párrafo 4.** El método del párrafo 1, en donde dicha molécula de co-acoplamiento es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.
- Párrafo 5.** El método del párrafo 1, en donde la célula es una célula B.
- 25 **Párrafo 6.** Una molécula de co-acoplamiento que tiene especificidad por la IgE, en donde dicha molécula de co-acoplamiento comprende una variante Fc de un polipéptido Fc parental, en donde dicha variante Fc tiene una afinidad de unión mejorada a FcγRIIb en relación con el polipéptido Fc parental.
- Párrafo 7.** La molécula de co-acoplamiento del párrafo 6, en donde dicha variante de Fc comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc en comparación con el polipéptido Fc parental, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es según el índice de EU.
- 30 **Párrafo 8.** La molécula de co-acoplamiento del párrafo 6, en donde dicha modificación es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en L235Y, G236D, S239D, V266M, S267E, H268D, H268E, L328F, L328W y L328Y 267D y 267E.
- Párrafo 9.** La molécula de co-acoplamiento del párrafo 8, en donde dicha modificación es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en 267D y 267E.
- 35 **Párrafo 10.** La molécula de co-acoplamiento del párrafo 9, que comprende además una sustitución seleccionada del grupo que consiste en 328F, 325D, 325Y, 239D, 332E, 268D, 268E, 236D, 236N, 328W, 328Y, 234D, 234E, 234W, 237D, 237N, 327D, 327E, 235F, 235R, 239E y 266M, en donde la numeración es según el índice EU.
- 40 **Párrafo 11.** Un anticuerpo que comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a la membrana, y en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd inferior a aproximadamente 100 nM.
- Párrafo 12.** El anticuerpo del párrafo 11, en donde el dominio VH de la región variable comprende una CDR1 de la SEC ID NO: 2, una CDR2 de la SEC ID NO: 3 y una CDR3 de la SEC ID NO: 4 o una CDR1 de la SEC ID NO: 18, una CDR2 de SEQ ID NO: 19 y una CDR3 de SEQ ID NO: 20.
- 45 **Párrafo 13.** El anticuerpo del párrafo 11, en donde el dominio VL de la región variable comprende una CDR1 de la SEC ID NO: 6, una CDR2 de la SEC ID NO: 7 y una CDR3 de la SEC ID NO: 8 o una CDR1 de la SEC ID NO: 22, una CDR2 de la SEC ID NO: 23 y una CDR3 de la SEC ID NO: 24.

#### Listado de secuencias

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

<120> Composiciones y métodos para el tratamiento de trastornos mediados por IgE

<130> 067461-5143-WO  
 <140> PCT/US2009/057366  
 <141> 2009-09-17  
 5 <150> US 61/097,819  
 <151> 2008-09-17  
 <160> 45  
 10 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 121  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Omalizumab VH Humanizado  
 20 <400> 1  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30  
 Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 2  
 25 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 2  
 Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp  
 30 1 5  
 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 35 <213> Mus musculus  
 <400> 3  
 Thr Tyr Asp Gly Ser  
 1 5

ES 2 727 677 T3

<210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 5 <213> Mus musculus  
  
 <400> 4  
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val  
 1 5 10  
  
 10 <210> 5  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> Omalizumab VL Humanizado  
  
 <400> 5  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30  
  
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
 35 40 45  
  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser  
 50 55 60  
  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His  
 85 90 95  
  
 20 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110  
  
 <210> 6  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 25 <213> Mus musculus  
  
 <400> 6  
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr  
 1 5 10  
  
 30 <210> 7  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 35 <400> 7  
 Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser  
 1 5  
  
 <210> 8  
 <211> 7  
 40 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 8

ES 2 727 677 T3

Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 9  
 <211> 121  
 5 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 9  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

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

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

Met Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asn Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

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

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

10 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> Mus musculus

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

20 <210> 11  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25 <400> 11  
 Thr Tyr Asp Gly Ser  
 1 5

<210> 12  
 <211> 12  
 30 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

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

35 <210> 13  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

ES 2 727 677 T3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

10

<400> 14

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

15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 15

Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser  
1 5

25

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 16

Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr  
1 5

35

<210> 17

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> H1L1MaE11 VH Humanizado

<400> 17

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

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

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

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

15 <400> 19  
Thr Tyr Asp Gly Ser  
1 5

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

25 <400> 20  
Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val  
1 5 10

<210> 21  
<211> 111  
<212> PRT  
30 <213> Mus musculus

<400> 21

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 <400> 23  
 Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser  
 1 5

20 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

25 <400> 24  
 Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5

30 <210> 25  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 25

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp  
 1 5

10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 27

Ser Pro Gly Thr Phe Thr  
 1 5

20

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Phe Ser His Phe Ser Gly Ser Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

25

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

30 <213> Mus musculus

<400> 29

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 30  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

10 <400> 30  
 Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
 1 5

15 <210> 31  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

20 <400> 31  
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

25 <210> 32  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

30 <400> 32  
 Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr  
 1 5

<210> 33  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 33

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 34

5

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 35  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Variante artificial de cadena constante S267E/L328F IgG1

10 <400> 35  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 36

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

10

<400> 36

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

245 250 255

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

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

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

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

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

<210> 37  
 <211> 218  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Variante artificial de cadena ligera Omalizumab (VH-C)

<400> 37  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Variante artificial de cadena pesada Omalizumab IgG1

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 39

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada Omalizumab S267E/L328F hartificial humanizada

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 40

<211> 218

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena ligera H1L1 MaE11 (VH-C) artificial humanizada

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41  
 <211> 451  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Cadena pesada H1L1 MaE11 IgG1 artificial humanizada

<400> 41  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 450

<210> 42  
 <211> 451  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Cadena pesada H1L1 MaE11 S267E/L328F artificial humanizada

<400> 42  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 727 677 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 450

5 <210> 43  
 <211> 5  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Enlazador glicina-serina  
 <400> 43  
 gsggs 5

15 <210> 44  
 <211> 5  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Enlazador glicina-serina  
 <400> 44  
 ggggs 5

25 <210> 45  
 <211> 4  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Enlazador glicina-serina  
 <400> 45  
 ggggs 4

35

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo para uso en el tratamiento de un trastorno mediado por IgE, en donde dicho anticuerpo comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a la IgE anclada a membrana y dicha región Fc es una variante de una región de IgG Fc humana parental que comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en S267E, S267E/L328F, G236D/S267E, S239D/S267E, y S239D/I332E, en donde la numeración es según el índice Eu de Kabat.
2. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en donde dicha región Fc variante comprende sustituciones de aminoácidos S267E/L328F.
3. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la región Fc parental es una IgG1 humana.
- 10 4. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1 a 3, en donde dicha región variable comprende seis regiones determinantes complementarias (CDR), VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3, en donde VH CDR1 comprende un aminoácido secuencia seleccionada de SEC ID NO: 2 y SEC ID NO:18, dicha VH CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 19, y dicha VH CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO: 4 y SEC ID NO: 20; dicha VL CDR1  
15 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO: 6 y la SEC ID NO: 22, dicha VL CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO: 7 y la SEC ID NO: 23, y dicha VL CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC ID NO: 8 y la SEC ID NO: 24.
- 20 5. El anticuerpo para uso según la reivindicación 4, en donde dicha VH CDR1 comprende la SEC ID NO: 18, la VH CDR2 comprende la SEC ID NO: 19, la VH CDR3 comprende la SEC ID NO: 20, la VL CDR1 comprende la SEC ID NO: 22, la VL CDR2 comprende SEC ID NO: 23, y VL CDR3 comprende SEC ID NO: 24.
6. El anticuerpo para uso según la reivindicación 4, en donde dicha VH CDR1 comprende la SEC ID NO: 2, la VH CDR2 comprende la SEC ID NO: 3, la VH CDR3 comprende la SEC ID NO: 4, la VL CDR1 comprende la SEC ID NO: 6, la VL CDR2 comprende SEC ID NO: 7, y VL CDR3 comprende SEC ID NO: 8.
- 25 7. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende una cadena pesada según la SEC ID N°: 42 y una cadena ligera según la SEC ID NO: 40.
8. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno mediado por IgE se selecciona de una enfermedad autoinmune y una enfermedad inflamatoria.
9. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno mediado por IgE es un trastorno alérgico o un trastorno atópico.
- 30 10. El anticuerpo para uso según la reivindicación 9, en donde dicho trastorno alérgico o un trastorno atópico se selecciona de asma alérgica, asma atópica, dermatitis atópica, eczema atópico, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, rinoconjuntivitis alérgica, rinitis conjuntivitis alérgica, encefalomielititis alérgica, rinitis alérgica vascular, shock anafiláctico, alergia ambiental y alergia alimentaria.
11. El anticuerpo para uso según la reivindicación 1, en donde dicho trastorno mediado por IgE es el asma.
- 35 12. Una composición que comprende:  
un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11; y  
un segundo ácido nucleico que codifica una cadena ligera del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Una célula huésped que comprende el primer ácido nucleico y el segundo ácido nucleico de la reivindicación 12.
- 40 14. Un método para producir el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 12 y recuperar el anticuerpo del cultivo celular.

Figura 1

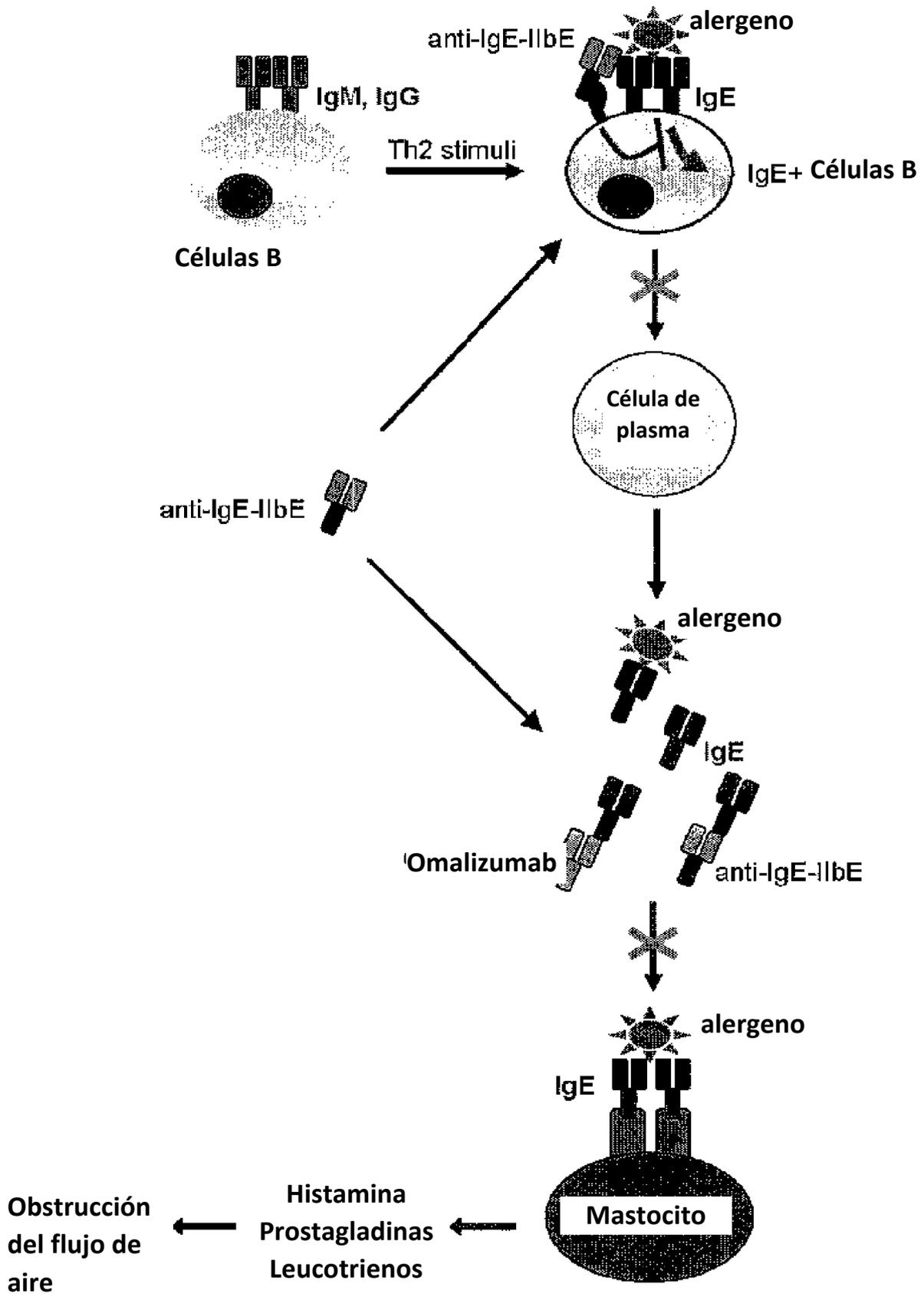


Figura 2

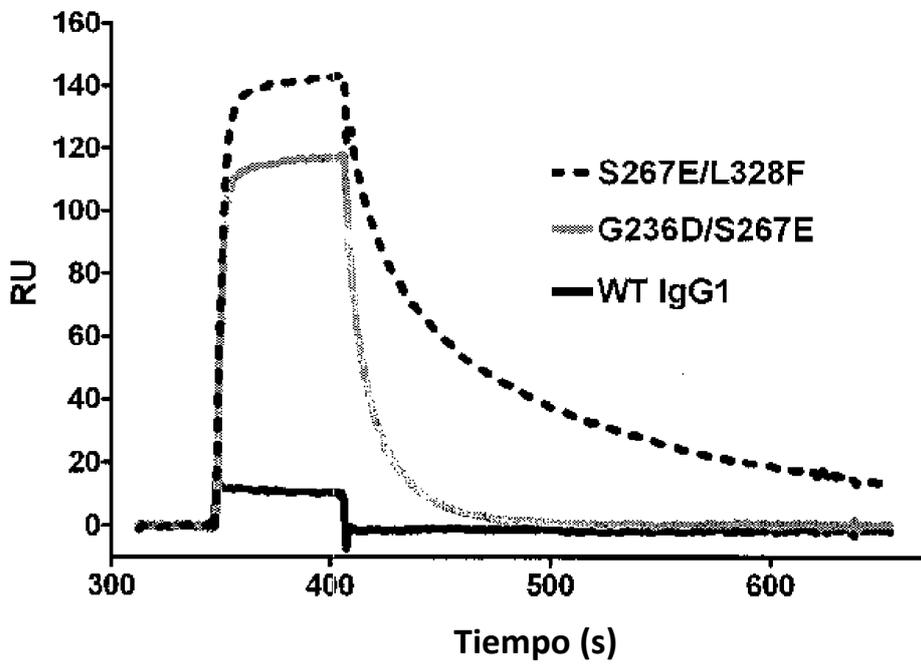
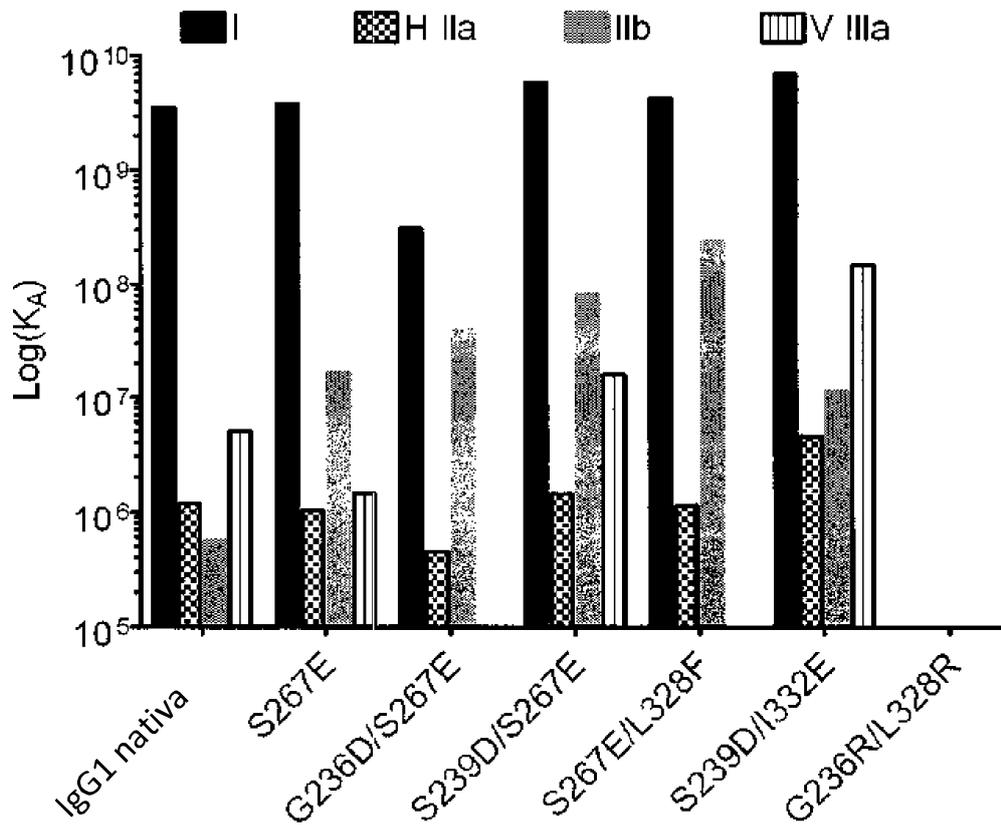


Figura 3



**Figura 4**

Anticuerpo	Fc $\gamma$ RI		H131 Fc $\gamma$ RIla		Fc $\gamma$ RIlb		V158 Fc $\gamma$ RIlla	
	KD (M)	Por vez	KD (M)	Por vez	KD (M)	Doblez	KD (M)	Por vez
IgG1 nativa	2,8E-10	1,0	8,5E-07	1,0	1,8E-06	1,0	2,0E-07	1,0
S267E	2,6E-10	1,1	9,6E-07	0,89	6,0E-08	30	6,9E-07	0,29
G236D/S267E	3,2E-09	0,088	2,2E-06	0,39	2,5E-08	72	n.d.	
S239D/S267E	1,7E-10	1,6	7,0E-07	1,2	1,2E-08	150	6,2E-08	3
S267E/L328F	2,3E-10	1,2	8,8E-07	0,97	4,2E-09	429	n.d.	
S239D/I332E	1,4E-10	2,0	2,2E-07	3,9	8,8E-08	20	6,8E-09	29
G236R/L328R	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	

**Figura 5**

Omalizumab VH (SEC ID NO: 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHHFAVWGQGLTVTS S

Omalizumab VH CDR1 (SEC ID NO: 2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEC ID NO: 3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEC ID NO: 4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEC ID NO: 5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES  
G  
VPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQHHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEC ID NO: 6)

QSVDYDGDSY

Omalizumab VL CDR2 (SEC ID NO: 7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEC ID NO: 8)

SHEPPYT

MaE11 VH (SEC ID NO: 9)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNY  
NPSLKNRISVTRDTSQNQFFLKLNSATAEPTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTS S

MaE11 VH CDR1 (SEC ID NO: 10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEC ID NO: 11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEC ID NO: 12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEC ID NO: 13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLGSEIPAR  
FSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEC ID NO: 14)

QSVDYDGDSY

MaE11 VL CDR2 (SEC ID NO: 15)

AASYLGS



**Figura 5 (Continuación)**

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

YASESIS

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

SDSWPTT

**Figura 6**

Cadena ligera de Ckappa (SEC ID NO: 33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASWCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena constante 1 IgG1 NATIVA (SEC ID NO: 34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVVCDCKTHTCPPCPAPELLGGPS

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

S267E/L328F cadena constante IqG1 (SEC ID NO: 35)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVVCDCKTHTCPPCPAPELLGGPS

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPP.PQPYYVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDQGNVGGPQNNKKTPLVLDSDGDSFFLYSKLQPQGNQGPNGQNG  
NGNVGNGNVGTNVGNVGPQNGNGNVGNVGNVGNVGHGNGHNGHNGHNGHNGHNGHNP  
HGNHVGHPGNHGNHGPNGHNPNGHNVGHPGNHGNHGPNGHNPNGHNPNGHNPNGHNP

G236D/S267E cadena constante IqG1 (SEC ID NO: 36)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVVCDCKTHTCPPCPAPELLDGPS

VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Figura 7**

Cadena ligera de omalizumab (VH-Ck) (SEC ID NO: 37)

DIQLTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES  
VPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASWCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL  
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de omalizumab IgG1 (SEC ID NO: 38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGQGLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada de omalizumab S267E/L328F (SEC ID NO: 39)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGQGLVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSWTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE  
MTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE  
IPARFSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFP  
SDEQLKSGTASWCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL  
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de H1L1 MaE11 IgG1 (SEC ID NO: 41)

QVQLQESGFLVKPSETLSLTCAVSGYSTSGYSWMMRQPPGKKB/VIGSrTYDGSSNYNPSLKSRTVIS  
RDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK

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

QVQLQESGFLVKPSETLSLTCAVSGYSTSGYSWMMRQPPGKKB/VIGSrTYDGSSNYNPSLKSRTVIS  
RDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSWTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVWDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRWSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVHHLVHYY  
QKSLSLSPGK

**Figura 8**

Anticuerpo	igE KD (M)	FcγRIIb KD (M)	Por vez FcγRIIb
Omalizumab_IgG1_WT	2,2E-10	1,94E-06	1,0
Omalizumab_IgG1_S267E/L328F	2,0E-10	1,4E-08	135
MaE11_H1L1_IgG1_WT	6,1E-11	2,0E-06	1,0
MaE11_H1L1_IgG1_S267E/L328F	6,3E-11	5,6E-09	366
MaE11_H1L1_IgG1_G236R/L328R	6,4E-11	NB	

**Figura 9**

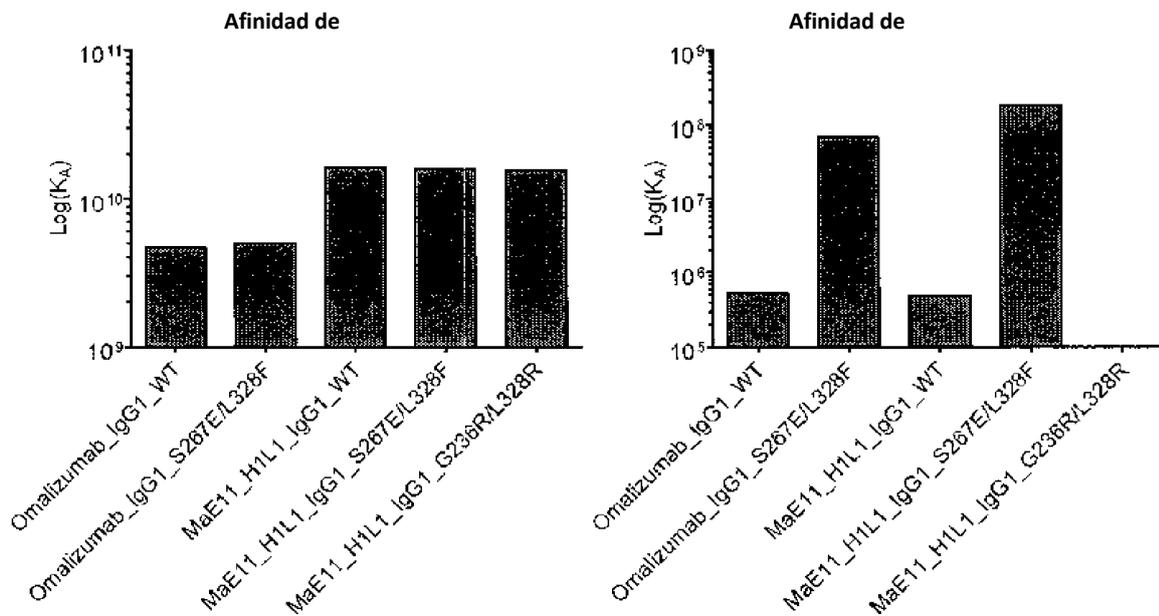


Figura 10

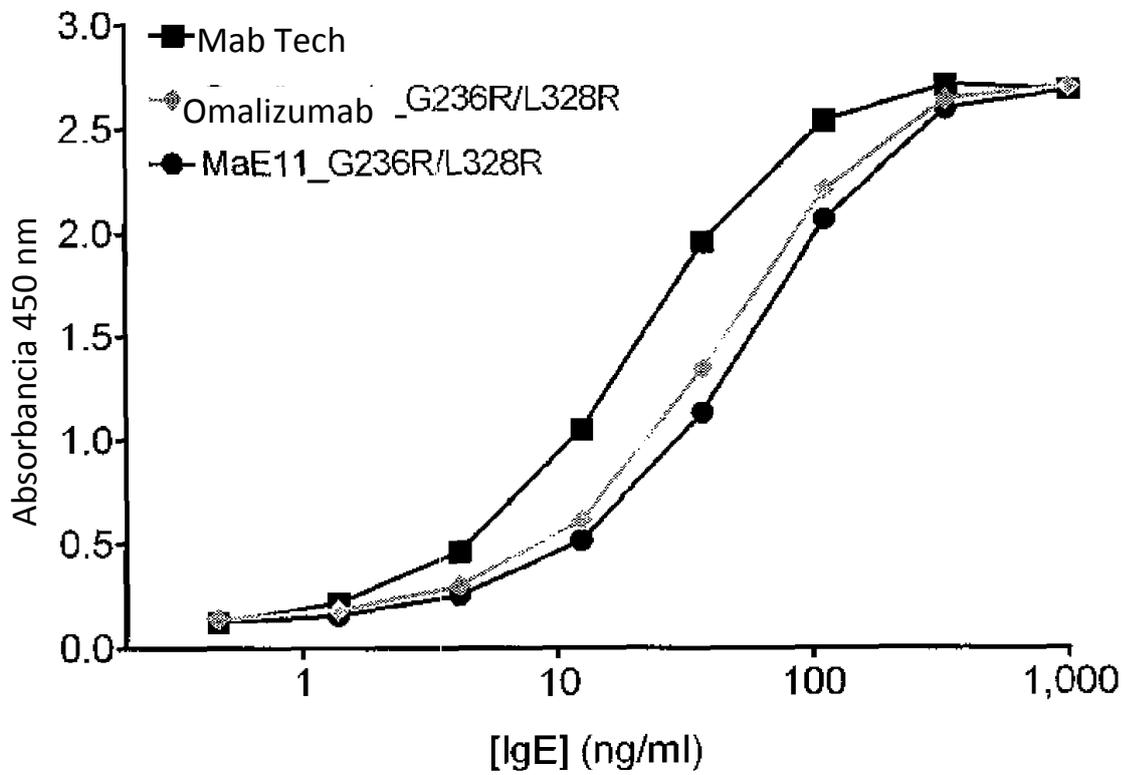


Figura 11

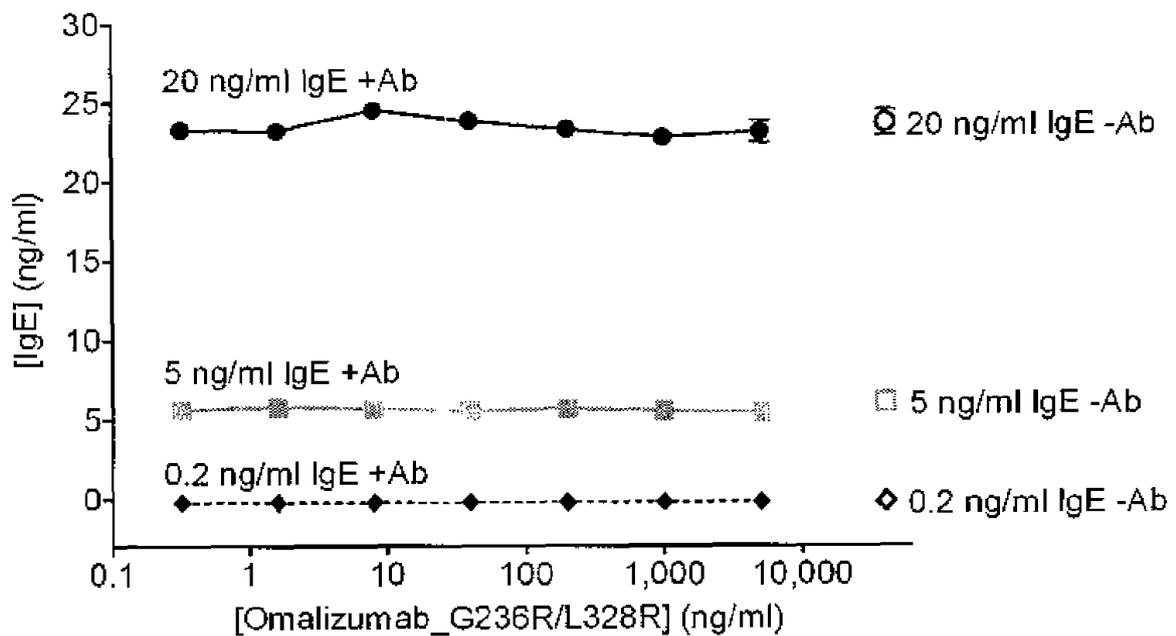


Figura 12

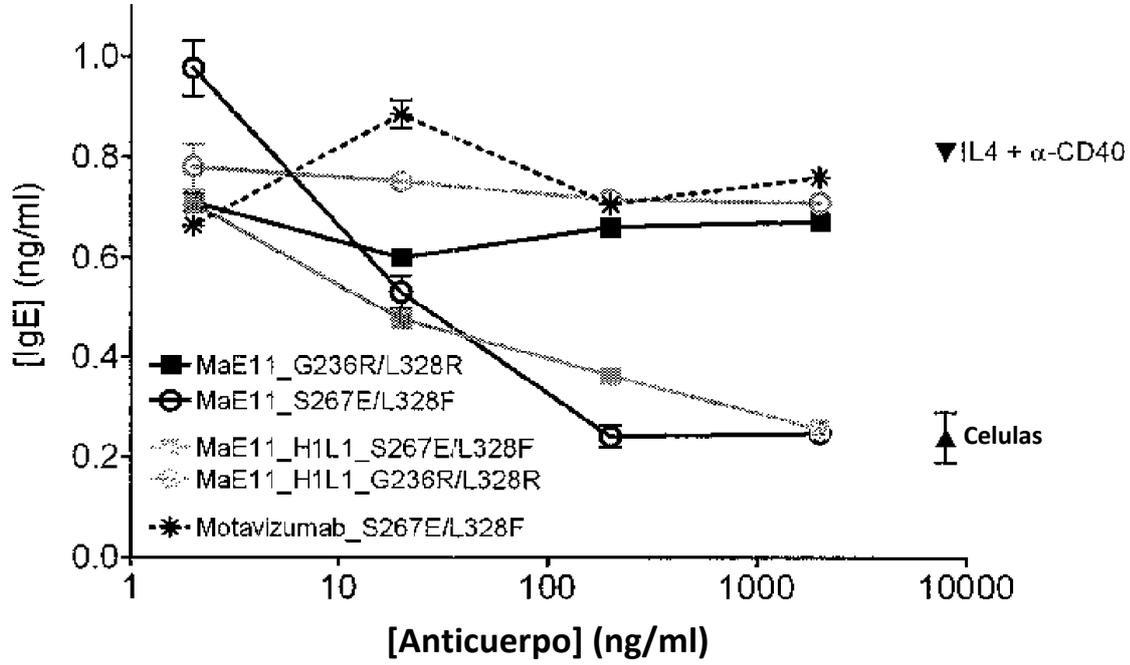


Figura 13

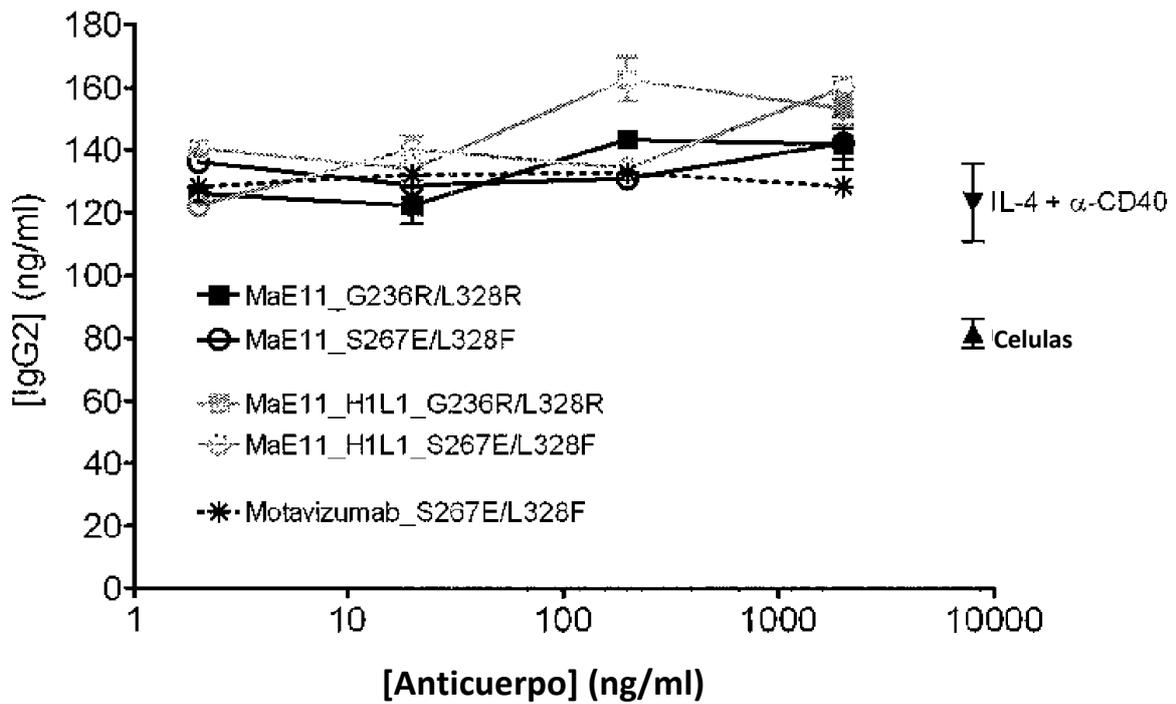


Figura 14

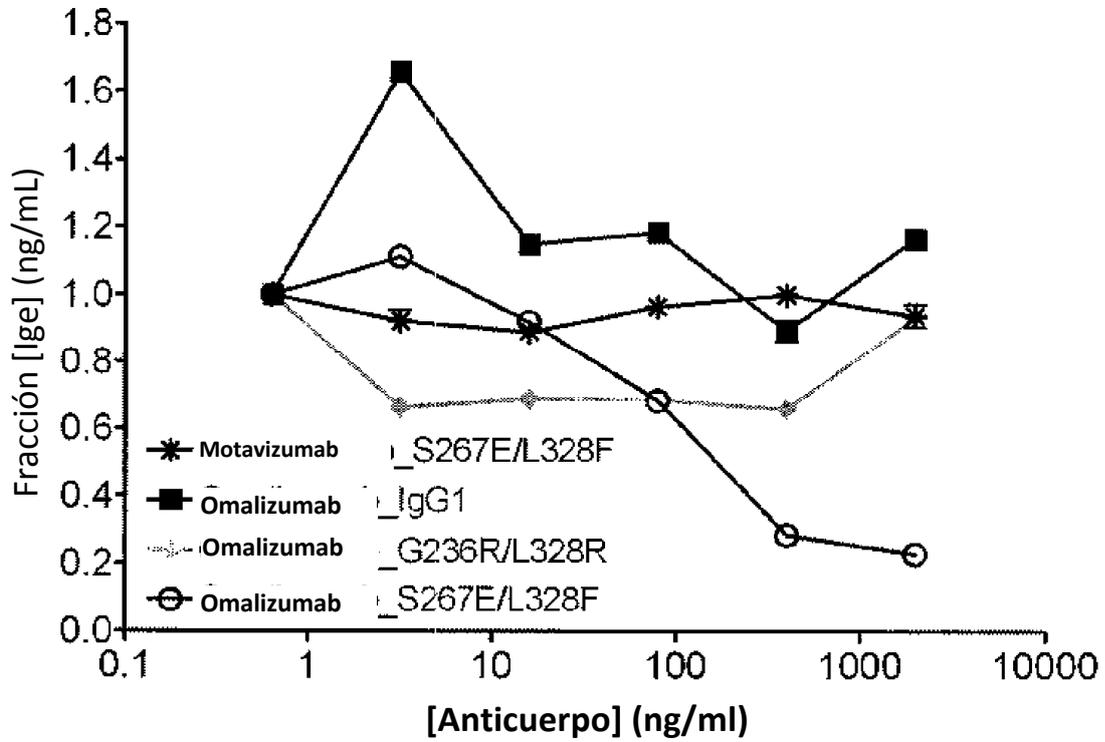


Figura 15

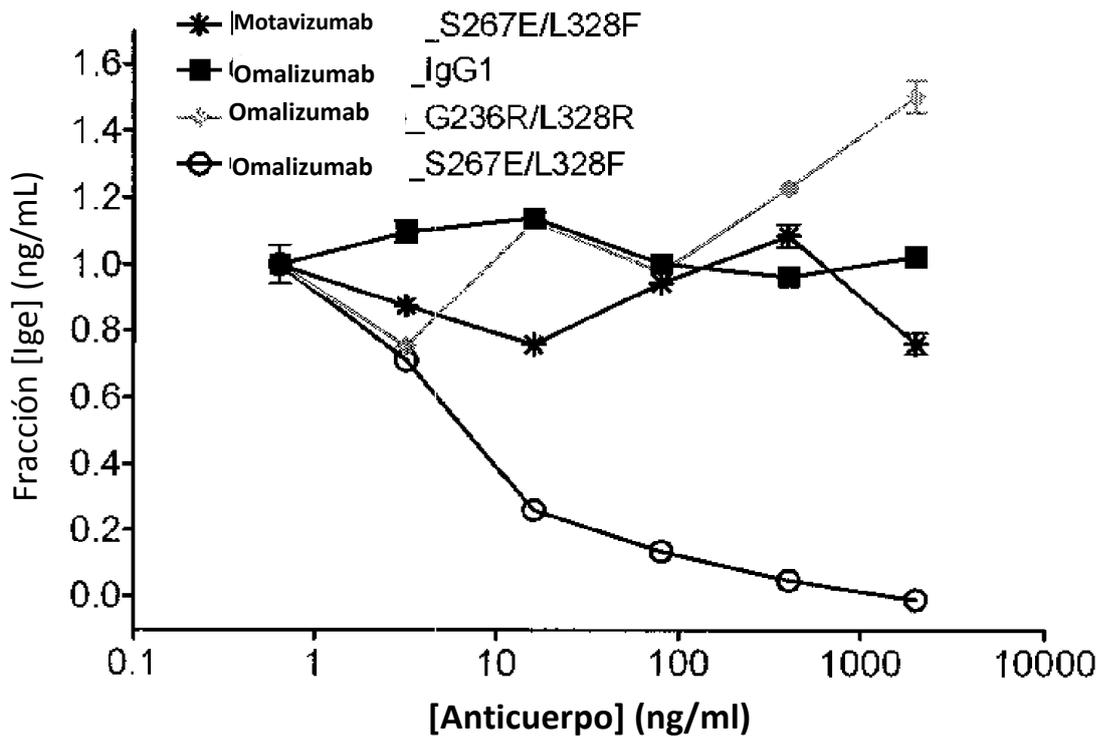


Figura 16

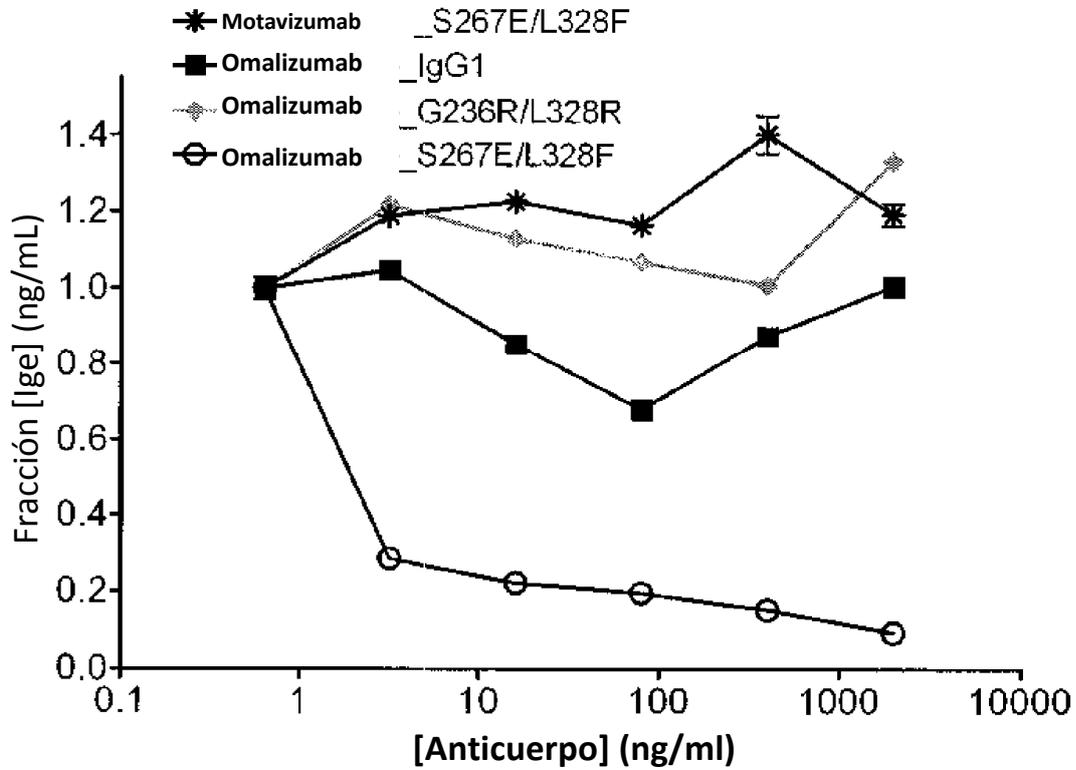


Figura 17

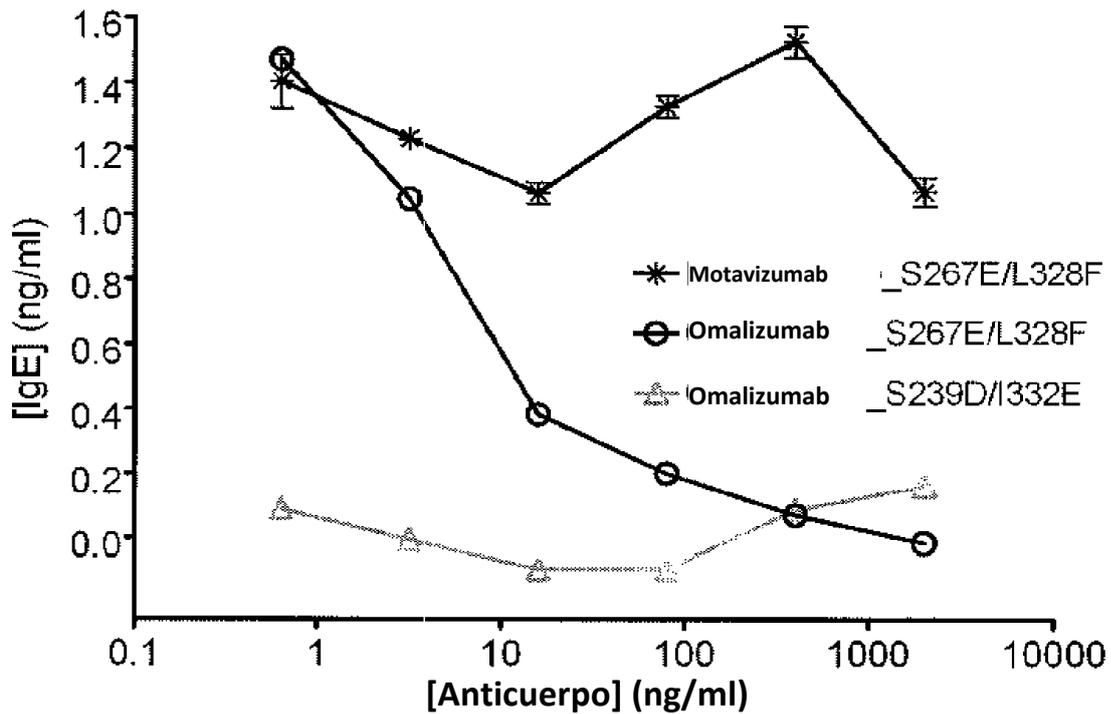


Figura 18

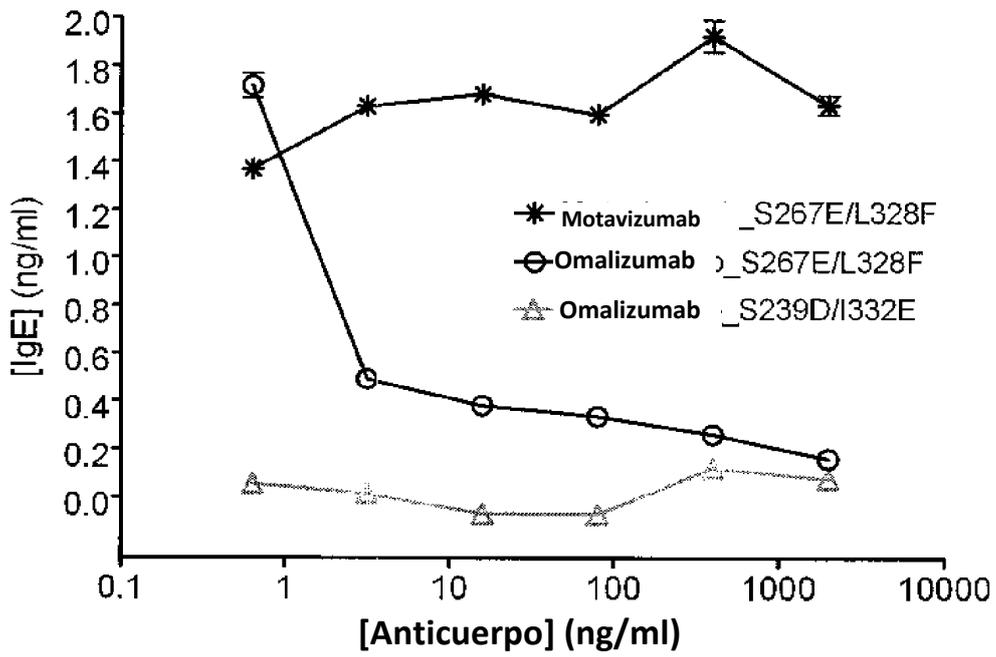


Figura 19

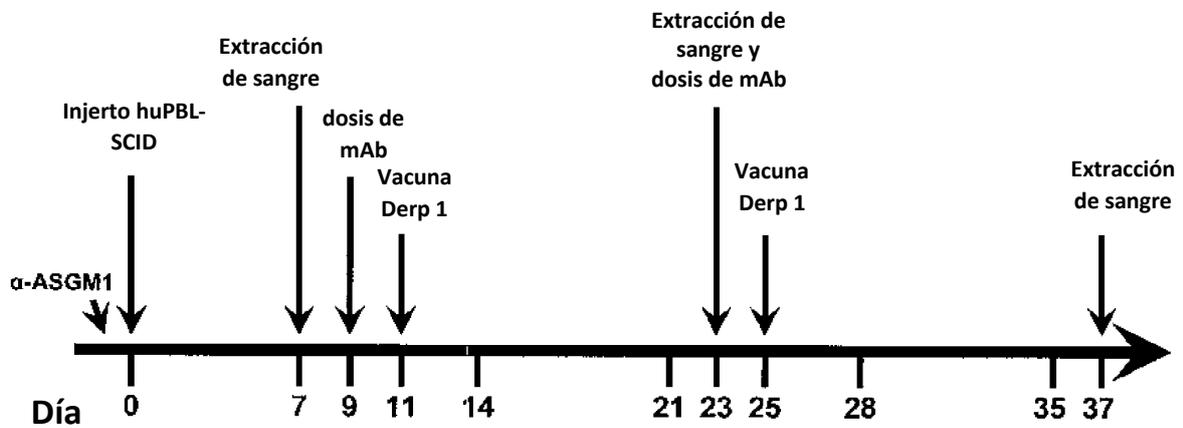


Figura 20

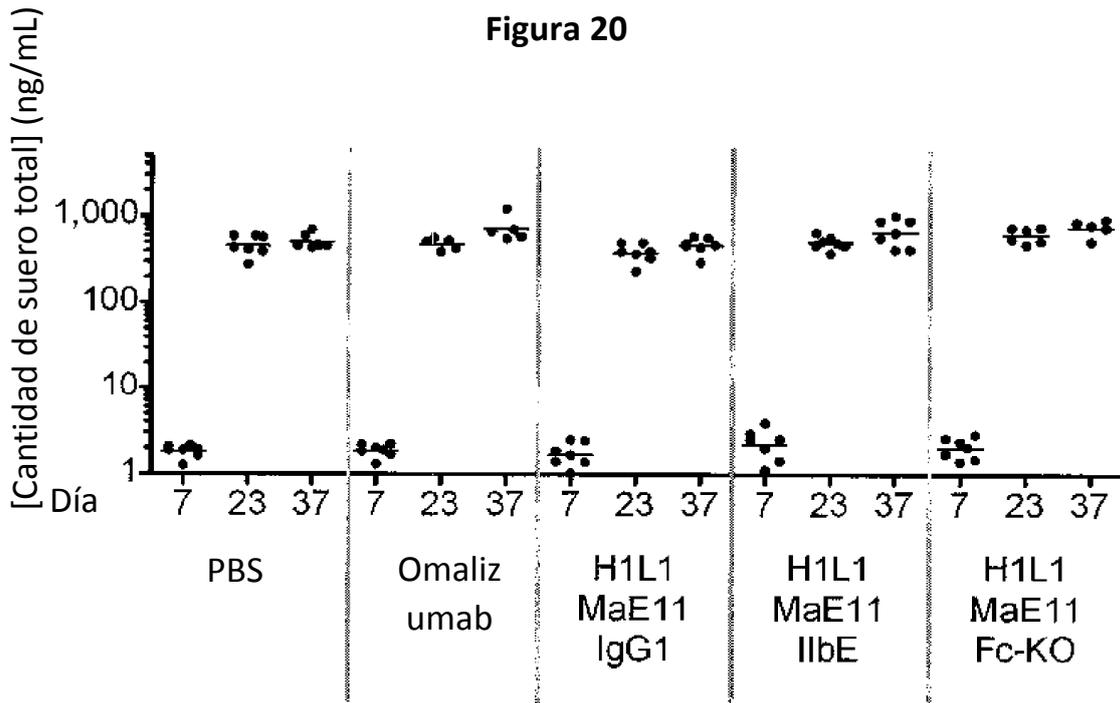


Figura 21

