

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 419**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/42** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 37/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 14167234 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2796469**

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

30 Prioridad:

**17.09.2008 US 97819 P**

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

**14.02.2020**

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 2 742 419 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

Nuevas composiciones y métodos para tratar trastornos mediados por IgE

**Campo técnico**

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

**Antecedentes de la invención**

10 Las enfermedades y los trastornos alérgicos, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, y alergias alimentarias, han ido aumentando en prevalencia a lo largo de las últimas décadas y ahora afectan al 10-40% de la población en países industrializados. Las enfermedades alérgicas afectan profundamente a la calidad de vida, y pueden provocar graves complicaciones, que incluyen la muerte, tal como puede ser en casos graves de asma y anafilaxis. Las alergias son prevalentes, y son la principal causa de baja laboral y escolar, y su impacto sobre la vida personal, así como los costes directos e indirectos para los sistemas médicos y económicos, son enormes. Por ejemplo, la rinitis alérgica (fiebre del heno) afecta al 22% o más de la población en EE. UU., mientras que se cree que el asma alérgico afecta al menos a 20 millones de residentes de los EE. UU. Se ha calculado que el impacto económico de las enfermedades alérgicas en EE. UU., incluyendo los costes de los cuidados médicos y la pérdida en la productividad, suman 6.400 millones de dólares solo en los primeros años de la década de los noventa.

20 La mayoría de las enfermedades alérgicas están provocadas por reacciones de hipersensibilidad mediadas por la inmunoglobulina E (IgE). La IgE es una clase de anticuerpo que normalmente está presente en el suero a concentraciones muy pequeñas. Es producida por células plasmáticas que segregan IgE que expresan el anticuerpo sobre su superficie en cierto estadio de su maduración. Los pacientes alérgicos producen niveles elevados de IgE con especificidad de unión por antígenos que normalmente son inocuos, a los cuales son sensibles. Estas moléculas de IgE circulan en la sangre y se unen a receptores específicos de IgE sobre la superficie de basófilos en la circulación y células cebadas a lo largo de los revestimientos mucósicos y bajo la piel. La unión del antígeno o alérgeno a IgE sobre las células cebadas, los basófilos y otros tipos de células, reticula las moléculas de IgE y agrega a los receptores subyacentes, activando así a las células para liberen mediadores estimuladores neuronales y vasoactivos, tales como histaminas, leucotrienos, prostaglandinas, bradiquinina y factor activador de plaquetas. La rápida reacción del sistema inmunológico frente al antígeno provocada por los compuestos inmunológicos de anticuerpos ha conducido a la expresión reacción de hipersensibilidad inmediata o mediada por anticuerpos, en contraste con las reacciones de hipersensibilidad retrasadas o mediadas por células, que son mediadas por células T. Las reacciones inmunológicas mediadas por IgE se denominan específicamente reacciones de hipersensibilidad de tipo I.

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

40 Puesto que la IgE desempeña un papel crucial en la mediación de la mayoría de las reacciones alérgicas, se ha creado un gran interés en diseñar tratamientos para controlar los niveles de IgE en el cuerpo y para regular la síntesis de IgE. Se han propuesto varias estrategias para tratar las enfermedades alérgicas mediadas por IgE mediante la infraregulación de los niveles de IgE. Una estrategia implica neutralizar las moléculas de IgE uniendo la cadena ε de IgE en el sitio de unión del receptor de Fc o cerca de este. Por ejemplo, el omalizumab (Xolair) es un anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado recombinante que se une a IgE en el mismo sitio de Fc que FcεRI. El omalizumab provoca una reducción en la IgE en circulación o en el suero total en pacientes atópicos, que atenúa la cantidad de IgE específica de antígeno que puede unirse y sensibilizar a los basófilos y células cebadas de tejidos. Esto, a su vez, conduce a una disminución en los síntomas de las enfermedades alérgicas. De manera interesante, los niveles de IgE en suero aumentan después del inicio de la terapia debido a la formación de un complejo de omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. En consecuencia, esta situación puede conducir a falsos negativos en ensayos de diagnóstico y, por tanto, los niveles de IgE deben comprobarse a menudo. Por consiguiente, son necesarios composiciones y métodos mejorados para reducir las enfermedades mediadas por IgE y los síntomas de las enfermedades.

55 El documento US 6037453 describe dos clases de polipéptidos derivados de la IgE humana. Una clase se une selectivamente al receptor de IgE de alta afinidad sobre células cebadas y basófilos, pero no al receptor de IgE de baja afinidad sobre células B, monocitos, eosinófilos y plaquetas. La otra clase se une al receptor de baja afinidad, pero no al receptor de alta afinidad.

Chu S.Y. *et al.*, Mol Immunol., septiembre de 2008, 45(15):3926-3933 describen la inhibición de la activación mediada por el receptor de células B de células B humanas primarias mediante el coacoplamiento de CD19 y FcγRIIb con anticuerpos con Fc modificado.

**Sumario de ejemplos de realizaciones**

- 5 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-IgE que comprende:
- una cadena pesada variable que consiste en SEQ ID NO:17;
- una cadena ligera variable que consiste en SEQ ID NO:21; y
- una región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácido comparada con una región Fc originaria, y en el que dicha modificación de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en S267E y S267E/L328F, según el índice de EU, y en el que la región Fc originaria es una IgG humana.
- 10 En otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de la invención.
- En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedante que comprende un ácido nucleico de la invención.
- En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende cultivar una célula hospedante de la invención y recuperar el anticuerpo a partir del cultivo celular.
- 15 En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo según la invención para su uso en el tratamiento del asma alérgico en un paciente.
- La presente descripción proporciona nuevas moléculas de coacoplamiento que se unen a IgE y FcγRIIb con alta afinidad, composiciones que comprenden dichas moléculas de coacoplamiento, y métodos para usar dichas nuevas moléculas de coacoplamiento para tratar trastornos mediados por IgE. Las moléculas de coacoplamiento descritas son capaces de inhibir células que expresan IgE y FcγRIIb en la membrana, es decir, células IgE+ FcγRIIb+. Las moléculas de coacoplamiento descritas también son capaces preferiblemente de unirse a la IgE en circulación. Los métodos inhibitorios descritos en la presente comprenden poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento que se coacopla a IgE y FcγRIIb sobre la superficie de la célula.
- 20 Las composiciones descritas en la presente incluyen moléculas de coacoplamiento capaces de coacoplarse a IgE y FcγRIIb con alta afinidad sobre la superficie de la célula. De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y FcγRIIb con alta afinidad. Las moléculas de coacoplamiento descritas preferiblemente se coacoplan a IgE y FcγRIIb anclados a la membrana sobre la superficie de una célula, y preferiblemente se unen a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento es una inmunoglobulina y, según la invención, la inmunoglobulina es un anticuerpo, en el que la región Fv de dicho anticuerpo se une específicamente a IgE. En una realización preferida, dicho anticuerpo se une a IgE en circulación y también anclada a la membrana. En otras realizaciones, dicho anticuerpo se une selectivamente a IgE anclada a la membrana con relación a la IgE en circulación. De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico que contiene una primera región específica de diana y una segunda región específica de diana, en la que la primera región específica de diana se une a IgE y la segunda región específica de diana se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De modo adecuado, dichas primera y segunda regiones específicas de diana son regiones Fv, en las que la primera región Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en la que dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En esta realización, el compañero de fusión de Fc de la inmunoglobulina se une a IgE.
- 25 De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento se une a FcγRIIb, en la que la afinidad de dicha unión presenta una Kd menor que aproximadamente 100 nM, por ejemplo, menor o igual que aproximadamente 95 nM, menor o igual que aproximadamente 90 nM, menor o igual que aproximadamente 85 nM, menor o igual que aproximadamente 80 nM, menor o igual que aproximadamente 75 nM, menor o igual que aproximadamente 74 nM.
- 40 De modo adecuado, la molécula de coacoplamiento que se une a IgE y FcγRIIb con alta afinidad incluye una inmunoglobulina variante con relación a la inmunoglobulina originaria. De modo adecuado, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en la que dicha región Fc variante comprende una o más (por ejemplo, dos o más) modificaciones, comparada con una región Fc originaria, en la que dicha una o más modificaciones se producen en posiciones seleccionadas 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 las que la numeración es según el índice de EU. De modo adecuado, la modificación o modificaciones se producen en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice de EU. De modo adecuado, la modificación o modificaciones se producen en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 266, 267, 268, 328, según el índice de EU. De modo adecuado, la modificación o modificaciones se producen en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268, y 328, según el índice de EU. De modo adecuado, la modificación o
- 45
- 50
- 55

modificaciones se producen en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, según el índice de EU.

5 En una realización, dichas una o más modificaciones 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 las que la numeración es según el índice de EU.

15 De modo adecuado, dichas una o más modificaciones 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 las que la numeración es según el índice de EU. De modo adecuado, dichas una o más modificaciones 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 las que la numeración es según el índice de EU.

25 De modo adecuado, dichas una o más modificaciones son al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 234E, 235Y, 235R, 236D, 236N, 237N, 266M, 267E, 268E, 268D, 327D, 327E, 328F, 328Y, 328W, en las que la numeración es según el índice de EU. De modo adecuado, dichas una o más modificaciones 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 las que la numeración es según el índice de EU. De modo adecuado, dichas una o más modificaciones son al menos una sustitución (por ejemplo, una o más sustituciones, dos o más sustituciones, etc.) seleccionadas del grupo que consiste en 235Y, 236D, 266M, 267E, 268E, 268D, 328F, 328Y, y 328W, en las que la numeración es según el índice de EU.

30 De modo adecuado, dichas una o más modificaciones producen 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 las que la numeración es según el índice de EU.

35 De modo adecuado, las modificaciones descritas en la presente reducen la afinidad por al menos un receptor con relación a la inmunoglobulina originaria, en el que dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRIIa, y FcγRIIIa. En este caso, los variantes de inmunoglobulina descritos en la presente pueden mediar en una ADCC o ADCP reducida, con relación a la inmunoglobulina originaria. De modo adecuado, las modificaciones descritas en la presente aumentan la afinidad por al menos un receptor con relación a la inmunoglobulina originaria, en el que dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en FcγRI, FcγRIIa, y FcγRIIIa. En este caso, los variantes de inmunoglobulina descritos en la presente pueden mediar en una ADCC o ADCP aumentada, con relación a la inmunoglobulina originaria.

En la presente también se describen métodos para modificar las nuevas moléculas de coacoplamiento, que incluyen composiciones de inmunoglobulinas.

45 En la presente también se describen ácido nucleicos aislados que codifican las moléculas de coacoplamiento, que incluyen las inmunoglobulinas descritas en la presente. En la presente también se describen vectores que comprenden los ácidos nucleicos, opcionalmente unidos operablemente a secuencias de control. En la presente también se describen células hospedantes que contienen los vectores, y métodos para producir y opcionalmente recuperar las moléculas de coacoplamiento.

50 En la presente también se describen moléculas de coacoplamiento que comprenden las inmunoglobulinas descritas en la presente. Las moléculas de coacoplamiento pueden usarse en un producto terapéutico. De modo adecuado, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden ser anticuerpos.

También se describen composiciones que comprenden las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente, y un vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

55 En la presente también se describen métodos para inhibir células IgE<sup>+</sup> FcγRIIb<sup>+</sup>. Los métodos para inhibir células descritos en la presente comprenden poner en contacto una célula IgE<sup>+</sup> FcγRIIb<sup>+</sup> con una molécula de coacoplamiento, en la que dicha molécula de coacoplamiento se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De modo adecuado, dicha molécula de coacoplamiento se coacopla a IgE y FcγRIIb sobre la superficie de la célula. De modo adecuado, los métodos de inhibición comprenden poner en contacto una

célula IgE+ FcγRIIb+ con un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se une a IgE a través de su región Fv, y en el que dicho anticuerpo comprende una región Fc, en la que dicha región Fc se une a FcγRIIb con un Kd de 100 nM o menor. De modo adecuado, dicha región Fc se une a FcγRIIa y/o FcγRIIIa con una afinidad que es más alta con relación a la IgG1 nativa.

- 5 De modo adecuado, los métodos comprenden poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en la que dicha molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico que comprende una primera región Fv y una segunda región Fv, en la que dicha primera región Fv se une a IgE, y dicha segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. Los métodos comprenden poner en contacto  
 10 células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en la que dicha molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc, en la que dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM.

La memoria descriptiva también describe un método para reducir la secreción de IgE. El método incluye poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coacoplamiento, en la que dicha molécula de coacoplamiento se une a IgE y FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM.

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

También se describen usos terapéuticos y de diagnóstico para las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente. De modo adecuado, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se usan para tratar uno o más trastornos mediados por IgE, por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias, etc.,  
 20 que son mediadas por la inmunoglobulina IgE.

De modo adecuado, los trastornos alérgicos y atópicos que pueden ser tratados mediante las composiciones descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a asma alérgico y atópico, dermatitis atópica y eccema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomielitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, choque anafiláctico, y alergias a cualquiera de una diversidad de alergias ambientales o alimentarias. Los métodos de  
 25 tratamiento descritos en la presente comprenden la administración a un paciente que necesite dicha administración de una cantidad terapéutica de una molécula de coacoplamiento que se acople a IgE y FcγRIIb sobre la superficie de una célula.

### Breve descripción de los dibujos

30 Figura 1. Ilustración de la nueva estrategia mecánica para inhibir células B IgE+ FcγRIIb+. Bajo los estímulos apropiados, las células B no expuestas pueden diferenciarse en células B IgE+. El acoplamiento del antígeno al receptor de células B de IgE activa estas células, que entonces se diferencian en células plasmáticas que liberan IgE en circulación. La unión de la IgE en circulación a FcεR, por ejemplo sobre células cebadas, basófilos y eosinófilos, activa estas células. La liberación de histamina, prostaglandinas y otros mediadores químicos provoca, en último  
 35 término, los síntomas clínicos de la alergia y el asma. El omalizumab, que tiene una región Fc de IgG1 nativa, es capaz de bloquear la unión de IgE a FcεR. Los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb, denominados anti-IgE-IIbE en la figura, son capaces no solo de bloquear la unión de IgE a FcεR, sino también de inhibir la activación de células B IgE+ mediante el acoplamiento a mIgE y FcγRIIb.

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

40 Figura 3. Afinidades de anticuerpos de Fc variante por FcγR humanos determinadas mediante Biacore. La gráfica muestra el log(K<sub>A</sub>) para la unión de anticuerpos WT IgG1 (WT, "wild type", tipo salvaje) y variantes a FcγRI humano (I), H131 FcγRIIa (H IIa), FcγRIIb (IIb), y V158 FcγRIIIa (VIIIa). No se detectó unión de G236D/S267E y S267E/L328F a V158 FcγRIIIa. No se detectó unión de G236R/L328R (Fc-KO) a ninguno de los receptores ensayados.

45 Figura 4. Afinidades de anticuerpos de Fc variante por FcγR humanos determinadas mediante resonancia de plasmón de superficie Biacore. La tabla proporciona las K<sub>D</sub> en equilibrio para la unión de anticuerpos WT IgG1 y variantes a FcγRI humano, H131 FcγRIIa, FcγRIIb, y V158 FcγRIIIa, y la unión en número de veces para cada uno con relación a la IgG1 nativa (WT). n.d. = no detectable.

50 Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada (VH) y ligera (VL) y CDR de anticuerpos anti-IgE. Los límites de las CDR se definieron según se ha descrito previamente, basándose en un alineamiento estructural de regiones variables de anticuerpos (Lazar *et al.*, 2007, Mol. Immunol., 44:1986-1998).

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

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

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. Diagrama de los datos de afinidad para la unión de anticuerpos anti-IgE WT y variantes a la región Fc de IgE y FcγRIIb.

5 Figura 10. ELISA de IgE usando anticuerpos anti-IgE del mercado (MabTech) y del laboratorio de los inventores (omalizumab y MaE11) como reactivos de captura.

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

10 Figura 12. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes potenciados para la afinidad por FcγRIIb, y no con anticuerpos que carecen de unión a FcγR (variante de Fc G236R/L328R) o que carecen de unión a IgE (motavizumab). El diagrama muestra la concentración de IgE liberada desde PBMC ("periferic blood mononuclear cells", células mononucleares de sangre periférica) después de 12 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

15 Figura 13. Los anticuerpos anti-IgE variantes no inhiben a las células B IgG2+ de clase cambiada. El diagrama muestra la concentración de IgG2 liberada desde PBMC después de 12 días de incubación con IL-4, α-CD40, y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

20 Figura 14. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes potenciados para la afinidad por FcγRIIb El diagrama muestra la concentración de IgE liberada desde 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.

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

30 Figura 16. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes potenciados para la afinidad por FcγRIIb El diagrama muestra la concentración de IgE liberada desde PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de entrecruzamiento de BCR anti-μ, y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la concentración más baja de anticuerpo.

Figura 17. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes potenciados para la función efectora de ADCC y ADCP. El diagrama muestra la concentración de IgE liberada desde PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de entrecruzamiento de BCR anti-CD79b, y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

35 Figura 18. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes potenciados para la función efectora de ADCC y ADCP. El diagrama muestra la concentración de IgE liberada desde PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de entrecruzamiento de BCR anti-μ, y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados.

40 Figura 19. Protocolo para un estudio de huPBL-SCID *in vivo* para ensayar la actividad de anticuerpos anti-IgE. Los días indicados reflejan el número de días después del injerto de PBMC procedentes de un donante positivo a anticuerpos IgE específicos para Der p 1. Vac. con Derp1 indica vacunación con el antígeno Der p 1.

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

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

### Descripción detallada de ejemplos de realizaciones

En la presente se describen moléculas de coacoplamiento que imitan los efectos inhibitorios del coacoplamiento de IgE anclada a la membrana con FcγRIIb en células B. Por ejemplo, en la presente se describen anticuerpos anti-IgE variantes modificados para que el dominio Fc se una a FcγRIIb con una afinidad mayor en hasta 430 veces. Con relación a la IgG1 nativa, los variantes potenciados para la unión a FcγRIIb (IIbE) inhiben con fuerza la movilización del calcio inducida por BCR y la viabilidad en células B IgE+ humanas primarias. El uso de una única molécula, tal como un anticuerpo, para suprimir las funciones de células B mediante el coacoplamiento de BCR de IgE y FcγRIIb cognados puede representar una nueva estrategia en el tratamiento de enfermedades mediadas por IgE. Los ejemplos no limitantes de enfermedades mediadas por IgE incluyen respuestas alérgicas y asma, y se describen con más detalle a continuación.

Las moléculas de coacoplamiento según la descripción pueden adoptar una diversidad de configuraciones, tal como se perfila con más detalle a continuación. En una realización, la molécula de coacoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y FcγRIIb con alta afinidad. En esta realización, la inmunoglobulina preferiblemente se coacopla a IgE anclada a la membrana y FcγRIIb sobre la superficie de una célula, y se une con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En otra realización específica, la molécula de coacoplamiento es una molécula biespecífica que contiene una primera región específica de diana y una segunda región específica de diana, en la que dicha primera región específica de diana se une a IgE y dicha segunda región específica de diana se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM, aunque en algunas realizaciones puede unirse a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 10 nM o una Kd menor que aproximadamente 1 nM y, en algunas realizaciones puede unirse con una Kd menor que aproximadamente 100 pM. En una realización preferida, la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico, y la primera y segunda regiones específicas de diana son regiones Fv, en las que la primera región Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En otra realización, la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en la que dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En esta realización, el compañero de fusión de Fc de la inmunoglobulina se une a IgE.

En la presente se describen varias definiciones. Estas definiciones pretenden incluir los equivalentes gramaticales.

"ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" ("antibody dependent cell-mediated cytotoxicity"), tal como se emplea en la presente, significa una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen un anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

"ADCP" o fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos ("antibody dependent cell-mediated phagocytosis"), tal como se emplea en la presente, significa una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen un anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.

Una "modificación de aminoácido" en la presente significa una sustitución, una inserción y/o una deleción de un aminoácido en una secuencia de polipéptido. Una "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en la presente significa el reemplazo de un aminoácido en una posición concreta en la secuencia de un polipéptido originario por otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S267E se refiere a un polipéptido variante, en este caso un variante de cadena pesada constante, en el que la serina en la posición 267 es reemplazada por ácido glutámico. Una "inserción de aminoácido" o "inserción", tal como se emplea en la presente, significa la adición de un aminoácido en una posición concreta en la secuencia de un polipéptido originario. Una "deleción de aminoácido" o "deleción", tal como se emplea en la presente, significa la eliminación de un aminoácido en una posición concreta en la secuencia de un polipéptido originario.

Un "anticuerpo" en la presente significa una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo, en seres humanos, incluyen los loci genéticos kappa (κ), lambda (λ), y de cadena pesada, que juntos forman la miríada de genes de la región variable, y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), IgE, e IgA (IgA1 e IgA2), respectivamente. Un anticuerpo en la presente pretende incluir anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos, y puede referirse a un anticuerpo natural procedente de cualquier organismo, un anticuerpo modificado, o recombinantes generados con anticuerpos para fines experimentales, terapéuticos u otros fines.

Un "aminoácido" e "identidad de aminoácido", tal como se emplea en la presente, significa uno de los 20 aminoácidos naturales o cualquier análogo no natural que pueda estar presente en una posición específica y definida.

Una "célula CD32b+" o "célula FcγRIIb+", tal como se emplea en la presente, significa cualquier célula o tipo de célula que expresa CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b+ incluyen, pero no se limitan a células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células cebadas, basófilos o eosinófilos.

Una "célula IgE+", tal como se emplea en la presente, significa cualquier célula o tipo de célula que expresa IgE. En realizaciones preferidas de la invención, las células IgE+ expresan IgE anclada a la membrana (mIgE). Las células IgE+ incluyen, pero no se limitan a células B y células plasmáticas.

5 La "CDC" o "citotoxicidad dependiente del complemento", tal como se emplea en la presente, significa una reacción en la que uno o más componentes de la proteína del complemento reconoce un anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provoca la lisis de la célula diana.

10 Una "molécula de coacoplamiento" o los equivalentes gramaticales significan una molécula bifuncional capaz de unirse a ambos IgE y FcγRIIb, en la que la Kd para la unión de la molécula a FcγRIIb es menor que aproximadamente 100 nM sobre la superficie de una célula, que resulta en la unión simultánea de ambos IgE y FcγRIIb.

15 Una "región constante" de un anticuerpo, tal como se define en la presente, significa la región del anticuerpo que es codificada por uno de los genes de la región constante de cadena pesada o ligera de inmunoglobulinas. Una "cadena ligera constante" o "región constante de cadena ligera", tal como se emplea en la presente, significa la región de un anticuerpo codificada por las cadenas ligeras kappa (Cκ) o lambda (Cλ). La cadena ligera constante generalmente comprende un dominio único y, tal como se define en la presente, se refiere a las posiciones 108-214 de Cκ o Cλ, en las que la numeración es según el índice de EU. Una "cadena pesada constante" o "región constante de cadena pesada", tal como se emplea en la presente, significa la región de un anticuerpo codificada por los genes mu, delta, gamma, alfa, o épsilon que definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, o IgE, respectivamente. Para los anticuerpos de IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, tal como se define en la presente, se refiere al N-terminal del dominio CH1 hasta el C-terminal del dominio CH3, comprendiendo así las posiciones 118-447, en las que la numeración es según el índice de EU.

20 Una "función efectora", tal como se emplea en la presente, significa un acontecimiento bioquímico que surge de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un ligando o receptor de Fc. Las funciones efectoras incluyen funciones efectoras mediadas por FcγR, tales como ADCC y ADPCP, y funciones efectoras mediadas por el complemento, tales como CDC.

25 Una "célula efectora", tal como se emplea en la presente, significa una célula del sistema inmunológico que expresa uno o más receptores de Fc y/o del complemento y que media en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero no se limitan a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, células cebadas, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales ("natural killers", NK), y células T γδ, y pueden proceder de cualquier organismo que incluye, pero no se limita a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos.

"Fab" o una "región Fab", tal como se emplea en la presente, significa los polipéptidos que comprenden los dominios de inmunoglobulina V<sub>H</sub>, CH1, V<sub>H</sub>, y C<sub>L</sub>. Fab puede referirse a esta región aislada o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de anticuerpo.

35 "Fc" o una "región Fc", tal como se emplea en la presente, significa el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de región constante de inmunoglobulina y, en algunos casos, parte de la bisagra. Así, Fc se refiere a los últimos dos dominios de región constante de inmunoglobulina de IgA, IgD, y IgG, y a los últimos tres dominios de región constante de inmunoglobulina de IgE y IgM, y a la bisagra flexible N-terminal a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende los dominios de inmunoglobulina Cγ2 y Cγ3 (Cγ2 y Cγ3) y la bisagra entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define como que comprende los restos C226 o P230 hasta su carboxilo-terminal, en los que 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 de Fc, como se describe a continuación.

40 Un "polipéptido de Fc", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc. Las inmunoglobulinas pueden ser polipéptidos de Fc.

45 Una "fusión de Fc", tal como se emplea en la presente, significa una proteína en la que uno o más polipéptidos están unidos operablemente a Fc. Una fusión de Fc en la presente es sinónima con los términos y expresiones "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina de receptor" (a veces con guiones), tal como se emplea 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 de Fc combina la región de Fc de una inmunoglobulina con un compañero de fusión que, en general, puede ser cualquier proteína, polipéptido o molécula pequeña. El papel de la parte no Fc de una fusión de Fc, es decir, el compañero de fusión, consiste en mediar en la unión a la diana y, por tanto, es funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo. Casi cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a un Fc para generar una fusión de Fc. Los compañeros 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 quimioquina u otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña

pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a una diana terapéutica. Estas dianas pueden ser cualquier molécula, por ejemplo, un receptor extracelular, que esté implicada en una enfermedad.

Un "receptor de Fc gamma" o "FcγR", tal como se emplea en la presente, significa cualquier miembro de la familia de proteínas que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG y que está sustancialmente codificado por los genes de FcγR. En seres humanos, esta familia incluye, pero no se limita a FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluyen FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol. Lett.*, 82:57-65), así como cualquier FcγR o alotipo o isoforma de FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede proceder de cualquier organismo, que incluyen, pero no se limita a seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcγR de ratón incluyen, pero no se limitan a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR o alotipo o isoforma de FcγR humanos no descubiertos.

Un "ligando de Fc" o "receptor de Fc", tal como se emplea en la presente, significa una molécula, por ejemplo, un polipéptido, procedente de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen, pero no se limitan a FcγR, FcγR, FcγR, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, y FcγR vírico. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor de Fc (FcRH), que son una familia de receptores de Fc que son homólogos con los FcγR (Davis *et al.*, 2002, *Immunological Reviews*, 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

Un "anticuerpo de longitud completa", tal como se emplea en la presente, significa la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, que incluye regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero y consiste en dos parejas idénticas de dos cadenas de inmunoglobulina, y cada pareja contiene una cadena ligera y una cadena pesada, y cada cadena ligera comprende los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2, y Cy3. En algunos mamíferos, por ejemplo, en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir de solo dos cadenas pesadas, y cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc.

Una "inmunoglobulina" en la presente significa una proteína que comprende uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos (que incluyen anticuerpos biespecíficos) y fusiones de Fc. Las inmunoglobulinas pueden presentar una serie de formas estructurales que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales.

Un "dominio de inmunoglobulina (Ig)", tal como se emplea en la presente, significa una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural diferenciada, comprobada por los expertos en la técnica de la estructura de las proteínas. Los dominios de Ig generalmente tienen una topología de plegamiento en β-sándwich característica. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo IgG de anticuerpos son VH Cy1, Cy2, Cy3, VL, y CL.

Una "IgG" o "inmunoglobulina IgG" o "inmunoglobulina G", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que son sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En los seres humanos, esta clase comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4.

Una "IgE" o "inmunoglobulina IgE" o "inmunoglobulina E", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que son sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina épsilon reconocido. Una IgE puede estar anclada a la membrana (mIgE), o no anclada a la membrana, que también se denomina en la presente IgE en circulación.

La "inhibición" de células o los equivalentes gramaticales significan prevenir o reducir la activación, la proliferación, la maduración o la diferenciación de células diana.

Un "isotipo", tal como se emplea en la presente, significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulinas humanas conocidas son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD, e IgE.

Un "modificación" en la presente significa una alteración en las propiedades físicas, químicas o de secuencia de una proteína, un polipéptido, un anticuerpo o una inmunoglobulina. Las modificaciones descritas en la presente incluyen modificaciones de aminoácidos y modificaciones de glicofoma.

Una "modificación de glicofoma" o "glicofoma modificada", tal como se emplea en la presente, significa una composición de carbohidratos que están unidos covalentemente a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, en la que dicha composición de carbohidratos se diferencia químicamente de la de una proteína originaria. Una glicofoma modificada generalmente se refiere al carbohidrato u oligosacárido diferente; así, por ejemplo, un variante de Fc puede comprender una glicofoma modificada. Como alternativa, una glicofoma modificada puede referirse al

variante de Fc que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente.

Un "polipéptido originario", "proteína originaria", "inmunoglobulina originaria", "polipéptido precursor", "proteína precursora", o "inmunoglobulina precursora", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido, proteína o inmunoglobulina no modificado que posteriormente se modifica para generar un variante, por ejemplo, cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que actúa como molde y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en la presente. El polipéptido originario puede ser un polipéptido natural, o un variante o versión modificada de un polipéptido natural. El polipéptido originario puede referirse al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido originario o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, un "polipéptido de Fc originario", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido de Fc que se modifica para generar un polipéptido de Fc variante, y un "anticuerpo originario", tal como se emplea en la presente, significa un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante (por ejemplo, un anticuerpo originario puede incluir, pero no se limita a una proteína que comprende la región constante de una Ig natural).

La "posición", tal como se emplea en la presente, significa una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente o según un formato establecido, por ejemplo, el índice de EU como se describe en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo de IgG1 humana.

Un "polipéptido" o una "proteína", tal como se emplea en la presente, significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.

Un "resto", tal como se emplea en la presente, significa una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, asparagina 297 (también denominada Asn297, también denominada N297) es un resto en el anticuerpo de IgG1 humana.

Un "antígeno diana", tal como se emplea en la presente, significa una molécula que se une a la región variable de un anticuerpo concreto, o el compañero de fusión de una fusión de Fc. Un antígeno diana puede ser una proteína, un carbohidrato, un lípido u otro compuesto químico. Se dice que un anticuerpo o una fusión de Fc es "específico" para un antígeno diana concreto basándose en su afinidad por el antígeno diana.

Una "célula diana", tal como se emplea en la presente, significa una célula que expresa un antígeno diana.

Una "región variable", tal como se emplea en la presente, significa la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes de  $V\kappa$ ,  $V\lambda$  y/o  $VH$  que forman los loci genéticos de inmunoglobulina kappa, lambda, y de cadena pesada, respectivamente.

Un "polipéptido variante", "variante de polipéptido" o "variante", tal como se emplea en la presente, significa una secuencia de polipéptido que se diferencia de la secuencia de un polipéptido originario en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido originario 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 de aminoácidos que lo codifica. En algunas realizaciones, los polipéptidos variantes descritos en la presente (por ejemplo, inmunoglobulinas variantes) pueden contener al menos una modificación de aminoácido comparado con el polipéptido originario, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., comparado con el polipéptido originario. La secuencia del polipéptido variante en la presente puede poseer al menos aproximadamente 80% de homología con una secuencia de polipéptido originario, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% de homología, 95% de homología, etc. Por consiguiente, un "variante de Fc" o "Fc variante", tal como se emplea en la presente, significa una secuencia de Fc que se diferencia de la secuencia de Fc originaria en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un variante de Fc puede incluir 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. Un variante de Fc puede referirse al propio polipéptido de Fc, a composiciones que comprenden el polipéptido del variante de Fc, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Un "variante de polipéptido de Fc" o "polipéptido de Fc variante", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido de Fc que se diferencia de un polipéptido de Fc originario en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un "variante de proteína" o "proteína variante", tal como se emplea en la presente, significa una proteína que se diferencia de una proteína originaria en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante", tal como se emplea en la presente, significa un anticuerpo que se diferencia de un anticuerpo originario en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un "variante de IgG" o "IgG variante", tal como se emplea en la presente, significa un anticuerpo que se diferencia de una IgG originaria en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Un "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante", tal como se emplea en la presente, significa una secuencia de inmunoglobulina que se diferencia de la secuencia de una inmunoglobulina originaria en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

"Tipo salvaje" o "WT" en la presente significa una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo las variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG WT, etc., tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no ha sido

modificada a propósito.

#### Moléculas de coacoplamiento

Tal como se describe en la presente, las moléculas de coacoplamiento son moléculas bifuncionales capaces de unirse a Fc $\gamma$ R11b e IgE sobre la superficie de una célula. Estas moléculas pueden adoptar una diversidad de configuraciones, tal como se perfila con más detalle en la presente. Preferiblemente, las moléculas de coacoplamiento son proteicas, aunque esto no es absolutamente necesario. En algunas realizaciones, la molécula de coacoplamiento puede ser una molécula bifuncional en la que la especificidad por Fc $\gamma$ R11b y/o IgE es conferida por una molécula pequeña, un ácido nucleico y/o un polipéptido, por ejemplo. Preferiblemente, la molécula de coacoplamiento se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En una realización preferida, la molécula de coacoplamiento incluye una inmunoglobulina que se une a IgE y Fc $\gamma$ R11b con alta afinidad. En esta realización, la inmunoglobulina preferiblemente se coacopla a IgE anclada en la membrana y Fc $\gamma$ R11b sobre la superficie de una célula. En otra realización, la molécula de coacoplamiento es una molécula biespecífica que contiene una primera región específica de diana y una segunda región específica de diana, en la que la primera región específica de diana se une a IgE y la segunda región específica de diana se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En una realización preferida, la molécula de coacoplamiento es un anticuerpo biespecífico, y la primera y segunda regiones específicas de diana son regiones Fv, en las que la primera región Fv se une a IgE, y la segunda región Fv se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En otra realización, la molécula de coacoplamiento es una fusión de Fc que comprende una región Fc, en la que dicha región Fc se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En esta realización, el compañero de fusión de Fc de la inmunoglobulina se une a IgE.

En una realización, la molécula de coacoplamiento es una molécula bifuncional en la que una primera región se une a IgE, y una segunda región se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. Casi cualquier proteína, molécula pequeña o ácido nucleico, por ejemplo, aptámeros, pueden unirse para generar la molécula de unión bifuncional y puede incluir conectores, tal como se perfila en la presente. En una realización preferida, los compañeros de fusión de proteínas 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 quimioquina u otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente que dirija la molécula de coacoplamiento a un antígeno diana, tal como IgE. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, la molécula de coacoplamiento puede comprender Fc $\epsilon$ R1 o Fc $\epsilon$ R11/CD23 como compañero de fusión. En realizaciones preferidas, las inmunoglobulinas se usan como moléculas de coacoplamiento.

#### Inmunoglobulinas

Tal como se describe en la presente, una inmunoglobulina es un componente preferido de una molécula de coacoplamiento y puede ser un anticuerpo, una fusión de Fc, un Fc aislado, un fragmento de Fc, o un polipéptido de Fc. En una realización, la inmunoglobulina es un anticuerpo. Tal como se perfila con más detalle a continuación, la inmunoglobulina se usa como una molécula bifuncional en la que la región Fv se une a IgE y la región Fc se une a Fc $\gamma$ R11b con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. Además, un anticuerpo se usa en las fusiones de Fc o los anticuerpos bifuncionales, según se perfila a continuación.

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

Las unidades estructurales de anticuerpo tradicionales generalmente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero generalmente está compuesto por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, y cada pareja contiene una cadena "ligera" (que generalmente tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que generalmente 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. La IgG tiene varias subclases que incluyen, pero no se limitan a IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. La IgM tiene subclases que incluyen, pero no se limitan a IgM1 e IgM2. La IgA tiene varias subclases que incluyen, pero no se limitan a IgA1 e IgA2. Así, un "isotipo", tal como se emplea en la presente, significa cualquiera de las clases y subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulinas humanas conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

Cada una de las cadenas ligera y pesada está formada por dos regiones diferenciadas, denominadas regiones variable y constante. La cadena pesada de IgG está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el N- al C-terminal en el orden de VH-CH1-CH2-CH3, que indica el dominio variable de cadena pesada, el dominio constante de cadena pesada 1, el dominio constante de cadena pesada 2, y el dominio constante de cadena pesada 3, respectivamente (también se denomina VH-C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 2-C $\gamma$ 3, que indica el dominio variable de

cadena pesada, el dominio constante gamma 1, el dominio constante gamma 2, y el dominio constante gamma 3, respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta de dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el N- al C-terminal en el orden de VL-CL, que indica el dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia, y son responsables de la unión a una serie de proteínas naturales para suscitar acontecimientos bioquímicos importantes. Las características diferenciadoras 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 al antígeno de la molécula y, por tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se denomina así porque es la que tiene la secuencia más diferenciada con respecto a 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 del antígeno. En la región variable, tres bucles están agrupados para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera para formar un sitio de unión al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina región determinante de la complementariedad (denominada en lo sucesivo en la presente "CDR", "complementarity-determining region"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es más significativa. Existen 6 CDR en total, tres por cada cadena pesada y ligera, denominadas VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3. La región variable fuera de las CDR se denomina la región de marco ("framework region", FR). Aunque no es tan diversa como las CDR, en la región FR aparece una variabilidad de secuencia entre diferentes anticuerpos. Globalmente, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un andamiaje estable (la región FR) sobre la cual el sistema inmunológico puede explorar una sustancial diversidad de unión al antígeno (las CDR) para obtener especificidad por una amplia gama de antígenos. Están disponibles una serie de estructuras de alta resolución para una diversidad de fragmentos de la región variable procedentes de diferentes organismos, algunas no unidas y otras en complejo con un antígeno. Se describen las características estructurales y de secuencia de regiones variables de anticuerpos, por ejemplo, en Morea *et al.*, 1997, *Biophys. Chem.*, 68:9-16; Morea *et al.*, 2000, *Methods*, 20:267-279, y se describen las características conservadas de anticuerpos, por ejemplo, en Maynard *et al.*, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2:339-376.

La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulina, existen varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Un "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente significa una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria diferenciada. Resultan de interés, en las realizaciones descritas en la presente, los dominios de cadena pesada, que incluyen los dominios constantes pesados (CH) y la región de bisagra. En el contexto de los anticuerpos de 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 índice de EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 según el índice de EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 según el índice de EU como en Kabat.

Otra región importante de la cadena pesada es la región bisagra. "Bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" o "región bisagra de la inmunoglobulina" en la presente significa el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y el segundo dominio constante de un anticuerpo. Desde el punto de vista estructural, el dominio IgG CH1 finaliza en la posición EU 220, y el dominio IgG CH2 comienza en el resto de la posición EU 237. Así, para IgG, la bisagra del anticuerpo se define en la presente de modo que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) hasta 236 (G236 en IgG1), en las que la numeración es según el índice de EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, refiriéndose en general la "bisagra inferior" a las posiciones 226 o 230 a 236.

Resultan de interés, en las realizaciones descritas en la presente, las regiones Fc. "Fc" o una "región Fc", tal como se emplea en la presente, significa el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de región constante de inmunoglobulina y, en algunos casos, parte de la bisagra. Así, Fc se refiere a los últimos dos dominios de región constante de inmunoglobulina de IgA, IgD, y IgG, y a los últimos tres dominios de región constante de inmunoglobulina de IgE y IgM, y a la bisagra flexible N-terminal 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 de bisagra inferior entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana habitualmente se define como que comprende los restos C226 o P230 hasta su carboxilo-terminal, en los que 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 de Fc, como se describe a continuación. Un "polipéptido de Fc", tal como se emplea en la presente, significa un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc.

La región Fc de un anticuerpo interacciona con una serie de ligandos y receptores de Fc, impartiendo una gama de importantes capacidades funcionales denominadas funciones efectoras. Para IgG, la región Fc comprende los dominios Cy2 y Cy3 de Ig y la bisagra N-terminal que conduce a Cy2. Una familia importante de receptores de Fc para la clase IgG son los receptores de Fc gamma (FcγR). Estos receptores median en la comunicación entre 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), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (que incluye los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluye FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluye los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol. Lett.*, 82:57-65).

- 5 Estos receptores generalmente poseen un dominio extracelular que media en la unión a Fc, una región que abarca la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar en ciertos acontecimientos de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una diversidad de células inmunológicas, que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, células cebadas, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK), y células T γγ. La formación del complejo de Fc/FcγR recluta a estas células efectoras hacia los sitios del antígeno unido, lo cual generalmente provoca acontecimientos de señalización dentro de las células e importantes respuestas inmunológicas posteriores, tales como la liberación de mediadores de la inflamación, la activación de células B, la endocitosis y el ataque citotóxico. La capacidad para mediar en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial mediante el cual los anticuerpos destruyen a las células diana. La reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("antibody dependent cell-mediated cytotoxicity", 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).
- 10
- 15
- 20 La reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la fagocitosis de la célula diana se denomina fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos ("antibody dependent cell-mediated phagocytosis", ADCP).

- 25 Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los FcγR, e IgG1 e IgG3 generalmente se unen 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 96% idénticos, aunque FcγRIIIb no posee un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que FcγRI, FcγRIIa/c, y FcγRIIIa son reguladores positivos de la activación desencadenada por el inmunocomplejo, que se caracterizan por poseer un dominio intracelular que contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunorreceptor ("immunoreceptor tyrosine-based activation motif", ITAM), FcγRIIb posee un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunorreceptor ("immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif", ITIM) y, por tanto, es inhibitorio. Así, los primeros se denominan receptores de activación, y FcγRIIb se denomina receptor inhibitorio. A pesar de estas diferencias en afinidades y actividades, todos los FcγR se unen a la misma región sobre Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cy2 y la bisagra precedente. Esta interacción está bien caracterizada desde el punto de vista estructural (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 registro pdb 1E4K) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature*, 406:267-273) (códigos de registro pdb 1IIS y 1IIX) (Radaev *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276:16469-16477).
- 30
- 35

- 40 Un sitio solapante, pero distinto, en Fc actúa como la interfase para la proteína del complemento C1q. De la misma forma en que la unión de Fc/FcγR media en ADCC, la unión de Fc/C1q media en la citotoxicidad dependiente del complemento ("complement dependent cytotoxicity", CDC). Un sitio sobre Fc entre los dominios Cy2 y Cy3 media en la interacción entre el receptor neonatal FcRn, cuya unión recicla el anticuerpo endocitado desde el endosoma de nuevo hacia la circulación sanguínea (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:181-220; Ghetie *et al.*, 2000, *Annu. Rev. Immunol.*, 18:739-766).

- 45 Este proceso, acoplado con la clausura de la filtración renal debido al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado unas semividas en suero del anticuerpo 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 para FcRn sobre Fc también es el sitio al cual se unen las proteínas A y G bacterianas. La unión fuerte por estas proteínas generalmente se aprovecha como un medio para purificar anticuerpos empleando una cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de las proteínas. La fidelidad de estas regiones, el complemento y las regiones de unión de FcRn/proteína A son importantes para las propiedades clínicas de los anticuerpos y su desarrollo.
- 50

- 55 Una característica clave de la región Fc es la glicosilación N-enlazada conservada que aparece en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido, como a veces se denomina, desempeña un papel estructural y funcional crucial para el anticuerpo, y es una de las principales razones por las que los anticuerpos deben producirse usando sistemas de expresión de mamíferos. La unión eficaz de Fc a FcγR y C1q requiere esta modificación, y las alteraciones en la composición del carbohidrato de N297 o su eliminación afecta a 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).
- 60

Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en la presente también puede ser una proteína similar a un anticuerpo, denominada fusión de Fc (Chamow *et al.*, 1996, Trends Biotechnol., 14:52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, Curr. Opin. Immunol., 9:195-200). Una "fusión de Fc" en la presente es sinónima con los términos "inmunoadhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina de receptor" (a veces con guiones), tal como se emplea 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 de Fc es una proteína en la que uno o más polipéptidos, denominados en la presente "compañeros de fusión", están unidos operablemente a Fc. Una fusión de Fc combina la región Fc de un anticuerpo y, por tanto, sus funciones efectoras favorables y farmacocinética, con la región de unión a la diana de un receptor, un ligando, u otra proteína o dominio de proteína. El papel de esta última consiste en mediar en el reconocimiento de la diana y, así, es funcionalmente análoga a la región variable de un anticuerpo. Debido al solapamiento estructural y funcional de las fusiones de Fc con los anticuerpos, el análisis de los anticuerpos en la presente memoria descriptiva se extiende también a las fusiones de Fc.

Casi cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a un Fc para generar una fusión de Fc. Los compañeros 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 quimioquina u otra proteína o dominio de proteína. Los compañeros de fusión de molécula pequeña pueden incluir cualquier agente que dirija la fusión de Fc a un antígeno diana. Este antígeno diana puede ser cualquier molécula, por ejemplo, un receptor extracelular, que esté implicada en una enfermedad. Las fusiones de Fc de las realizaciones descritas en la presente preferiblemente tienen especificidad por IgE. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, las fusiones de Fc de la invención pueden comprender FcεRI o FcεRII/CD23 como compañero de fusión. Las fusiones de Fc de la invención preferiblemente comprenden uno o más variantes en la región Fc que potencian la afinidad por FcγRIIb.

Los compañeros de fusión pueden estar unidos a cualquier región de una región Fc, incluyendo a los N- o C-terminales, o a otro resto entre los terminales. En una realización, un compañero de fusión está unido en el N- o C-terminal de la región Fc. Puede usarse una diversidad de conectores, en algunas realizaciones descritas en la presente, para unir covalentemente las regiones Fc a un compañero de fusión. Un "conector", "secuencia de conector", "espaciador", "secuencia de sujeción" o sus equivalentes gramaticales, en la presente significa una molécula o grupo de moléculas (tales como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y que a menudo actúa para colocar las dos moléculas en una configuración. Los conectores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los conectores homo- o heterobifuncionales son muy conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticulantes, pp. 155-200).

Puede usarse una serie de estrategias para unir covalentemente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a conexiones de polipéptidos entre los N- y C-terminales de proteínas o dominios de proteínas, conexión a través de enlaces disulfuro, y conexión a través de reactivos reticulantes químicos. En un aspecto de esta realización, el conector es un enlace peptídico, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El conector peptídico puede incluir predominantemente los siguientes restos aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El conector peptídico debe tener una longitud que sea adecuada para conectar dos moléculas de tal forma que asuman la configuración correcta entre sí de manera que conserven la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este fin incluyen al menos uno y no más de 50 restos aminoácidos. En una realización, el conector tiene una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos. En una realización, pueden usarse h conectores con una longitud de 1 a 20 aminoácidos. Los conectores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:1), (GGGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:2), y (GGGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:3), en los que n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros conectores flexibles, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse como conectores una diversidad de polímeros no proteicos que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, para unir regiones Fc a un compañero de fusión.

También se contemplan polipéptidos de Fc como compañeros de fusión. Así, una inmunoglobulina, tal como se describe en la presente, puede ser un polipéptido de Fc multimérico, que comprende dos o más regiones Fc. La ventaja de esta molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para receptores de Fc en una única molécula de proteína. En una realización, las regiones de Fc pueden conectarse usando una estrategia de modificación química. Por ejemplo, pueden conectarse Fab y Fc mediante enlaces tioéter que se originan en restos cisteína en las bisagras, generando moléculas, tales como FabFc<sub>2</sub>. Las regiones Fc pueden conectarse usando modificación de disulfuro y/o reticulación química. En una realización, las regiones Fc pueden conectarse genéticamente. En una realización, las regiones Fc de una inmunoglobulina se conectan genéticamente para generar regiones de Fc conectadas en tándem, según se describe en USSN 11/022.289, presentado 21/12/2004, titulado "Polipéptidos de Fc con nuevos sitios de unión al ligando de Fc". Los polipéptidos de Fc conectados en tándem pueden comprender dos o más regiones Fc, por ejemplo de una a tres regiones Fc, dos regiones Fc. Puede resultar ventajoso explorar una serie de construcciones modificadas para obtener regiones Fc homo- o heteroconectadas en tándem con las propiedades funcionales y estructurales más favorables. Las regiones Fc conectadas en tándem pueden ser regiones Fc homoconectadas en tándem, es decir, una región Fc de un isotipo condensada genéticamente con otra región Fc del mismo isotipo. Se prevé que, debido a que existen múltiples sitios de unión a FcγR, C1q y/o FcRn en los polipéptidos de Fc conectados en tándem, podrían potenciarse las funciones efectoras y/o la farmacocinética. En

una realización alternativa, regiones Fc procedentes de diferentes isotipos pueden conectarse en tándem, y estas se denominan regiones Fc heteroconectadas en tándem. Por ejemplo, debido a la capacidad para dirigirse a receptores FcγR y FcαRI, una inmunoglobulina que se une a ambos FcγR y FcαRI puede proporcionar una mejora clínica significativa.

5 Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en la presente pueden ser sustancialmente codificadas por genes de inmunoglobulina que pertenezcan a cualquiera de las clases de anticuerpos. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente se usan en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a la clase IgG de anticuerpos, que incluye IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. La figura 1 proporciona un alineamiento de estas secuencias de IgG humana. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas descritas en  
10 la presente se usan en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a las clases IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG, o IgM de anticuerpos. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender más de una cadena de proteína, por ejemplo, pueden ser un anticuerpo o una fusión de Fc que es un monómero o un oligómero, incluyendo un homo- o hetero-oligómero.

15 Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden estar sustancialmente codificadas por genes procedentes 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, platirrinos (monos del Nuevo Mundo), cercopitecos (monos del Viejo Mundo), y homínidos, que incluyen gibones y grandes y pequeños simios. En ciertas realizaciones, las  
20 inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ser sustancialmente humanas.

Tal como se conoce en la técnica, existen polimorfismos de inmunoglobulinas en la población humana. El polimorfismo de Gm es determinado por los genesIGHG1, IGHG2 e IGHG3 que poseen alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos denominados alotipos G1m, G2m, y G3m para marcadores de moléculas de  
25 IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se han descubierto alotipos de Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores pueden clasificarse en "alotipos" e "isoalotipos". Se distinguen según 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 pesada o ligera de diferentes individuos. Incluso una única diferencia de aminoácido puede producir un determinante alotípico, aunque en muchos casos se han producido varias sustituciones de  
30 aminoácidos. Los alotipos son diferencias de secuencia entre alelos de una subclase, por las cuales los antisueros reconocen solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo de un isotipo que produce un epitopo que es compartido con una región homóloga no polimórfica de uno o más isotipos distintos y, debido a esto, los antisueros reaccionarán con los alotipos pertinentes y los isotipos homólogos pertinentes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem. Immunol., 65:88-110; Gorman y Clark, 1990, Semin. Immunol., 2(6):457-466).

35 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 Evan, 1986, Allotypic markers, Monogr. Allergy, 19:40-51).

40 Además, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim *et al.*, 2001, J. Mol. Evol., 54:1-9, incorporado en la presente en su totalidad como referencia). En la actualidad, se conocen 18 alotipos de 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).

45 Los alotipos que se heredan en combinaciones fijas se denominan haplotipos de Gm. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden estar sustancialmente codificadas por cualquier alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

50 Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden incluir un polipéptido de Fc, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, Fc aislados, fragmentos de Fc y fusiones de Fc. En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente 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 parejas idénticas de dos cadenas de inmunoglobulina, y cada pareja contiene una cadena ligera y una cadena pesada, y cada cadena ligera comprende los dominios de inmunoglobulina VL y CL, y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2, y Cy3. En otra realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente son regiones Fc o fragmentos de Fc aislados.

55 Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden presentar una diversidad de estructuras, que incluyen, pero no se limitan a fragmentos de anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominadas "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 un único variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab conectados, (vii) moléculas de Fv monocatenarias (mcFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están conectados por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros de Fv monocatenarios biespecíficos, y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos mediante fusión génica. Los fragmentos de anticuerpos pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que conectan los dominios VH y VL. Se describen ejemplos de arquitecturas y formatos de anticuerpos en Holliger y Hudson, 2006, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology, 6:343-357, y las referencias citadas en ellos.

En una realización, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo multiespecífico y, de modo notable, un anticuerpo biespecífico, denominado a veces "diacuerpo". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden fabricarse mediante una diversidad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, pueden prepararse 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 puede unirse a la región Fc y puede incluir toda o parte de la región bisagra. Para una descripción de anticuerpos multiespecíficos, véase Holliger y Hudson, 2006, Nature Biotechnology, 23(9):1126-1136, y las referencias citadas en él.

Anticuerpos no humanos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos

La región variable de un anticuerpo, tal como se conoce en la técnica, puede incluir secuencias procedentes de una diversidad de especies. En algunas realizaciones, la región variable del anticuerpo puede proceder de una fuente no humana que incluye, pero no se limita a ratones, ratas, conejos, camellos, llamas y monos. En algunas realizaciones, los componentes del andamiaje pueden ser una mezcla procedente de diferentes especies. Así, un anticuerpo descrito en la presente puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, "anticuerpos quiméricos" y "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones procedentes de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprenden una o más regiones variables procedentes de un ratón u otra especie no humana, y una o más regiones constantes procedentes de un ser humano.

Los "anticuerpos humanizados" en general se refieren a anticuerpos no humanos cuyas regiones de marco de dominio variable se han cambiado por secuencias que se encuentran en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo entero, excepto las CDR, es codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a uno de estos anticuerpos excepto por sus CDR. Las CDR, algunas de las cuales o todas están codificadas por ácidos nucleicos originarios de un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad es determinada por las CDR injertadas. La creación de estos anticuerpos se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/11018, Jones, 1986, Nature, 321:522-525, Verhoeyen *et al.*, 1988, Science, 239:1534-1536. A menudo se requiere la "retromutación" de restos del marco aceptor seleccionados hacia los correspondientes restos del donante para recuperar la afinidad que se ha perdido en la construcción injertada inicial (patente de EE. UU. n.º 5.693.762).

El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, generalmente la de una inmunoglobulina humana y, por tanto, generalmente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse usando ratones con un sistema inmunológico genéticamente modificado (Roque *et al.*, 2004, Biotechnol. Prog., 20:639-654). En la técnica se conoce una diversidad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos (véase, Tsurushita y Vásquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.), y las referencias citadas en él). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos puede incluir métodos de resurgimiento, tal como se describe, por ejemplo, en Roguska *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:969-973. En una realización, el anticuerpo originario se ha madurado por afinidad, tal como se conoce en la técnica. Pueden emplearse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en el documento U.S. n.º de serie 11/004.590. Pueden emplearse métodos basados en la selección para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto de solo partes de las CDR, que incluyen, pero no se limitan a métodos descritos en el documento USSN 09/810.502; Tan *et al.*, 2002, J. Immunol., 169:1119-1125; De Pascalis *et al.*, 2002, J. Immunol., 169:3076-3084. Pueden emplearse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en el documento USSN 10/153.159 y solicitudes relacionadas. En ciertas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce usando un método descrito en Lazar *et al.*, 2007, Mol. Immunol., 44:1986-1998 y el documento USSN 11/004.590, titulado "Métodos para generar proteínas variantes con mayor contenido en la hebra del hospedante y sus composiciones", presentado el 3 de diciembre de 2004.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano con al menos una modificación como se perfila en la presente. Un "anticuerpo totalmente 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 perfiladas en la presente. Pueden obtenerse anticuerpos totalmente humanos, por ejemplo, usando ratones transgénicos (Bruggemann *et al.*, 1997, Curr. Opin. Biotechnol., 8:455-458) o bancos de anticuerpos humanos acoplados con métodos de selección (Griffiths *et al.*, 1998, Curr. Opin. Biotechnol., 9:102-108). En una realización, pueden generarse anticuerpos equivalentes a humanos por ordenador, como se perfila en el documento PCT/US09/41144.

#### Anticuerpos anti-IgE

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se unen a IgE. Los anticuerpos anti-IgE de la invención pueden comprender cualquier región variable, conocida o aún no conocida, que tenga especificidad por 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 incluyendo E25, E26, y E27, en particular E25, también conocido como rhuMab-E25, también conocido como omalizumab, tales como los descritos en los documentos US6761889, US6329509, US20080003218A1, y Presta, L.G. *et al.*, 1993, J. Immunol., 151:2623-2632.

Una versión modificada preferida de MaE11 es H1L1 MaE11, descrito en los ejemplos de la presente. Otros anti-IgE que pueden ser útiles para la invención incluyen el anticuerpo murino TES-C21, TES-C21 quimérico, también conocido como CGP51901 (Come, 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 modificadas de este anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a CGP56901, también conocido como TNX-901, tales como los anticuerpos descritos en Kolbinger, F. *et al.*, 1993, Protein Eng., 6:971-980. Otros anticuerpos anti-IgE que pueden usarse para la invención se describen en los documentos US6066718, US6072035, PCT/US04/02894, 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 al receptor de Fc

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender un variante de Fc. Un variante de Fc comprende una o más modificaciones de aminoácidos con relación al polipéptido de Fc originario, y estas una o más modificaciones proporcionan una o más propiedades optimizadas. Un variante de Fc descrito en la presente se diferencia en la secuencia de aminoácidos de su originario en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Así, los variantes de Fc descritos en la presente tienen al menos una modificación de aminoácido, comparado con el originario. Como alternativa, los variantes de Fc descritos en la presente pueden contener más de una modificación de aminoácido comparado con el originario, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente cincuenta modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., comparado con el originario. Así, las secuencias de los variantes de Fc y las del polipéptido de Fc originario son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias variantes del Fc variante de la presente poseerán aproximadamente 80% de homología con la secuencia del variante de Fc originario, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% de homología, al menos aproximadamente 95% de homología, al menos aproximadamente 98% de homología, al menos aproximadamente 99% de homología, etc. Las modificaciones descritas en la presente incluyen modificaciones de aminoácidos, que incluyen inserciones, deleciones y sustituciones. Las modificaciones descritas en la presente también incluyen modificaciones de glicofoma. Las modificaciones pueden realizarse de modo genético usando la biología molecular, o pueden realizarse de modo enzimático o químico.

Los variantes de Fc descritos en la presente se definen según las modificaciones de aminoácidos que los componen. Así, por ejemplo, S267E es un variante de Fc con la sustitución S267E con relación al polipéptido de Fc originario. De modo similar, S267E/L328F define un variante de Fc con las sustituciones S267E y L328F con relación al polipéptido de Fc originario. La identidad del aminoácido WT puede no especificarse, en cuyo caso, el variante mencionado anteriormente se denomina 267E/328F. Se advierte que el orden en el cual se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, por ejemplo, 267E/328F es el mismo variante de Fc que 328F/267E, etc. A menos que se indique lo contrario, las posiciones analizadas en la presente se numeran según el índice de EU o el esquema de numeración de EU (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda).

El índice de EU o el índice de EU como en Kabat o el esquema de numeración de EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman *et al.*, 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:78-85).

En ciertas realizaciones, los variantes de Fc descritos en la presente se basan en secuencias de IgG humanas y, así, las secuencias de IgG humanas se emplea como las secuencias "base" frente a las cuales se comparan otra secuencias que incluyen, pero no se limitan a secuencias procedentes de otros organismos, por ejemplo, secuencias de roedores y primates. Las inmunoglobulinas también pueden comprender secuencias procedentes de otras clases

de inmunoglobulinas, tales como IgA, IgE, IgG, IgGM, y similares. Se contempla que, aunque los variantes de Fc descritos en la presente se modifican en el contexto de una IgG originaria, los variantes pueden modificarse o "trasladarse" al contexto de otra segunda IgG originaria. Esto se realiza determinando los restos "equivalentes" o "correspondientes" y las sustituciones entre la primera y la segunda IgG, generalmente basándose en la homología de secuencia o estructural entre las secuencia de la primera y la segunda IgG. Para establecer la homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG perfilada en la presente se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, usando uno o más programas de alineamiento de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando restos conservados entre especies), permitiendo las inserciones y deleciones necesarias para mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados por una deleción e inserción arbitrarias), se definen los restos equivalentes a aminoácidos concretos en la secuencia primaria de la primera inmunoglobulina. El alineamiento de los restos conservados puede conservar 100% de dichos restos. Sin embargo, un alineamiento mayor que 75% o tan bajo como 50% de restos conservados también es adecuado para definir los restos equivalentes. Los restos equivalentes también pueden definirse determinando la homología estructural entre una primera y una segunda IgG que existe al nivel de la estructura terciaria para IgG cuyas estructuras se han determinado. En este caso, los restos equivalentes se definen como los restos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un resto aminoácido concreto del originario o precursor (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de aproximadamente 0,13 nm, después del alineamiento. En otra realización, los restos equivalentes están dentro de aproximadamente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se logra después de haber orientado y colocado el modelo mejor para conseguir el máximo solapamiento de las coordenadas atómicas de los átomos que no son hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los restos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG originaria en la que se preparan las IgG, lo que se quiere indicar es que los variantes de Fc descubiertos tal como se describe en la presente pueden modificarse en cualquier segunda IgG originaria que tenga una homología de secuencia o estructural significativa con el variante de Fc. Así, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en el que el anticuerpo originario es una IgG1 humana, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar restos equivalentes, el anticuerpo variante puede modificarse en otro anticuerpo de IgG1 originario que se une a un antígeno diferente, un anticuerpo IgG2 originario humano, un anticuerpo IgA originario humano, un anticuerpo IgG2a o IgG2b originario de ratón, y similares. De nuevo, como se describió anteriormente, el contexto del variante de Fc originario no afecta a la capacidad para trasladar los variantes de Fc descritos en la presente a otras IgG originarias.

Los variantes de Fc descritos en la presente pueden optimizarse para una diversidad de propiedades de unión al receptor de Fc. Un variante de Fc que se modifica o que se predice que mostrará una o más propiedades optimizadas se denomina en la presente un "variante de Fc optimizado". Las propiedades que pueden optimizarse incluyen, pero no se limitan a una afinidad potenciada o reducida por un FcγR. En una realización, los variantes de Fc descritos en la presente se optimizan para que posean una afinidad potenciada por un receptor inhibitorio FcγRIIb. En otras realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente proporcionan una afinidad potenciada por FcγRIIb, pero una afinidad reducida por uno o más FcγR activantes, que incluyen, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR pueden expresarse sobre células procedentes de cualquier organismo, que incluyen, pero no se limitan a seres humanos, monos cynomolgus y ratones. Los variantes de Fc descritos en la presente pueden optimizarse para que posean una afinidad potenciada para FcγRIIb humano.

Una "mayor afinidad" o "afinidad mejorada" o "afinidad potenciada" o "mejor afinidad" que un polipéptido de Fc originario, tal como se emplea en la presente, significa que un variante de Fc se une a un receptor de Fc con una constante de asociación en equilibrio significativamente mayor ( $K_A$  o  $K_a$ ) o una constante de disociación en equilibrio menor ( $K_D$  o  $K_d$ ) que el polipéptido de Fc originario cuando las cantidades de polipéptido variante y originario en el ensayo de unión son fundamentalmente iguales. Por ejemplo, el variante de Fc con mejor afinidad de unión por el receptor de Fc puede mostrar una mejora en aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces, por ejemplo, de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces en la afinidad de unión por el receptor de Fc, comparado con el polipéptido de Fc originarios, cuando la afinidad de unión al receptor de Fc es determinada, por ejemplo, mediante los métodos de unión descritos en la presente, que incluyen, pero no se limitan a Biacore, por los expertos en la técnica. Por consiguiente, una "afinidad reducida", comparada con un polipéptido de Fc originario, tal como se emplea en la presente, significa que un variante de Fc se une con un receptor de Fc con una  $K_A$  significativamente menor o una  $K_D$  mayor que el polipéptido de Fc originario. Una afinidad mayor o reducida también puede definirse con relación a un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, según los datos de la presente, IgG1 WT (nativa) se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 2  $\mu\text{M}$ , o de aproximadamente 2000 nM. Además, algunos variantes de Fc descritos en la presente se unen a FcγRIIb con una afinidad aproximadamente 10 veces mayor que a IgG1 WT. Tal como se describe en la presente, una afinidad mayor o potenciada significa que tiene una  $K_D$  menor que aproximadamente 100 nM, por ejemplo, entre aproximadamente 10 nM a aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nM, o menor que aproximadamente 1 nM.

Los anticuerpos anti-IgE de la invención preferiblemente tienen alta afinidad por FcγRIIb. Una alta afinidad en la presente significa que la afinidad de la interacción entre el anticuerpo y FcγRIIb es más fuerte que 100 nM. Esto es lo mismo que decir que la constante de disociación en equilibrio  $K_d$  para la unión del anticuerpo a FcγRIIb es menor que 100 nM.

En una realización, los variantes de Fc proporcionan una afinidad selectivamente potenciada por FcγRIIb con

relación a uno o más receptores activantes. Una afinidad selectivamente potenciada significa que el variante de Fc tiene una afinidad mejorada por FcγRIIb con relación al receptor o receptores activantes, comparado con el polipéptido de Fc originario, pero tiene una afinidad reducida por el receptor o receptores activantes, comparado con el polipéptido de Fc originario, o significa que el variante de Fc tiene una afinidad mejorada por FcγRIIb y el receptor o receptores activantes, comparado con el polipéptido de Fc originario, aunque la mejora en la afinidad es mayor para FcγRIIb que para el receptor o receptores activantes. En realizaciones alternativas, los variantes de Fc reducen o cortan la unión a uno o más FcγR activantes, reducen o cortan la unión a una o más proteínas del complemento, reducen o cortan una o más funciones efectoras mediadas por FcγR y/o reducen o cortan una o más funciones efectoras mediadas por el complemento.

La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγR proporciona otro parámetro que influye en la utilidad terapéutica de los variantes de Fc descritos en la presente. Mientras que la especificidad y la selectividad de un variante de Fc concreto por las diferentes clases de FcγR afecta significativamente a la capacidad de un variante de Fc para dirigirse a un antígeno concreto para el tratamiento de una enfermedad concreta, la especificidad o la selectividad de un variante de Fc por diferentes formas polimórficas de estos receptores puede determinar, en parte, cuáles serían los experimentos de investigación o preclínicos apropiados para ensayar y, en último término, cuáles serán las poblaciones de pacientes que respondan o no al tratamiento. Así, la especificidad o la selectividad de los variantes de Fc descritos en la presente por polimorfismos del receptor de Fc, que incluyen, pero no se limitan a FcγRIIa, FcγRIIIa y similares, puede usarse para guiar la selección de experimentos de investigación y preclínicos válidos, el diseño de ensayos clínicos, la selección de pacientes, la dependencia de la dosificación y/u otros aspectos concernientes a los ensayos clínicos.

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

Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de un variante de Fc concreto para tratar una enfermedad concreta es el contexto del variante de Fc. Así, la selectividad o la especificidad del receptor de Fc por un variante de Fc concreto proporcionará diferentes propiedades, dependiendo de que incluya un anticuerpo, una fusión de Fc, o variantes de Fc con un compañero de fusión acoplado. En una realización, la especificidad por el receptor de Fc del variante de Fc descrito en la presente determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de un variante de Fc concreto para fines terapéuticos dependerá del epitopo o forma del antígeno diana y de la enfermedad o indicación que se está tratando. Para algunas dianas e indicaciones, puede ser beneficiosa una mayor afinidad por FcγRIIb y unas funciones efectoras mediadas por FcγR activantes reducidas. Para otros antígenos diana y aplicaciones terapéuticas, puede resultar beneficioso aumentar la afinidad por FcγRIIb, o aumentar la afinidad por FcγRIIb y receptores activantes.

Medios para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE

En la presente se describen medios para alterar la afinidad por uno o más FcγR. En una realización preferida, se altera la afinidad por el receptor inhibitorio FcγRIIb, alterando con ello la capacidad de la inmunoglobulina para mediar en una o más funciones efectoras inhibitorias mediadas por FcγRIIb. Los medios de la invención incluyen modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, medios de posición para optimizar la función, medidos de sustitución para optimizar la función, etc.) y modificaciones de glicoforma (por ejemplo, medios para modificaciones de la glicoforma).

#### *Modificaciones de aminoácidos*

En la presente se describen inmunoglobulinas que comprenden modificaciones de aminoácidos, en las que dichas modificaciones alteran la afinidad por uno o más FcγR. Preferiblemente, dichas modificaciones de aminoácidos mejoran la afinidad por FcγRIIb. Sin embargo, en algunas realizaciones, las modificaciones pueden mejorar la afinidad por uno o más receptores activantes, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, y FcγRIIIa. Se describen modificaciones para alterar la unión a FcγR en el documento USSN 11/124.620, presentado el 5 de mayo de 2005, titulado "Variantes de Fc optimizados", y el documento USSN 12/156.183, presentado el 30 de mayo de 2008, titulado "Métodos y composiciones para inhibir células que expresan CD32b".

Tal como se describe en la presente, los medios de posición para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE incluyen, pero no se limitan a la modificación de un aminoácido en una o más posiciones de la región constante de 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 FcγRIIb de la inmunoglobulina, la función efectora y, potencialmente, las propiedades clínicas de los anticuerpos.

En particular, los medios de sustitución para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE, por ejemplo, alterando 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 cadena pesada (por ejemplo, una o más de las sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones de la región constante de cadena pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326,

327, 328, 329, 330, 331, y 332, en las que la numeración es según el índice de EU). En una realización, los medios de sustitución incluyen al menos una (por ejemplo, dos o más) sustituciones, comparado con una región Fc originaria, en las que dichas una o más modificaciones se realizan en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, y 332, según el índice de EU. En una realización, los medios de sustitución incluyen una o más (por ejemplo, dos o más) sustituciones en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268, y 328, según el índice de EU.

En una realización, dichos medios de sustitución consisten en 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución consisten en 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, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 330D, 330H, 330K, y 332E, en las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución consisten en 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución consisten en 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 las que la numeración es según el índice de EU.

En una realización, dichos medios de sustitución consisten en al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución consisten en 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución consisten en al menos dos sustituciones (por ejemplo, una combinación de modificaciones) en posiciones 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 las que la numeración es según el índice de EU.

En una realización, dichos medios de sustitución producen 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución producen al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D,

239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 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 las que la numeración es según el índice de EU. En una realización, dichos medios de sustitución producen al menos una de las siguientes sustituciones, o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 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 una realización, dichos medios de sustitución producen 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 las que la numeración es según el índice de EU.

En algunas realizaciones de la invención, la inmunoglobulina puede comprender medios para las modificaciones isotópicas, es decir, modificaciones en una IgG originaria para conseguir el tipo de aminoácido en una IgG distinta. Por ejemplo, puede construirse un variante híbrido IgG1/IgG3 mediante un medio de sustitución para sustituir posiciones de la IgG1 en la región CH2 y/o CH3 por los aminoácidos de la IgG3 en posiciones en las que los dos isotipos difieren. Así, puede construirse un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprenda uno o más medios de sustitución, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R, y 436F. En otras realizaciones de la invención, puede construirse un variante híbrido IgG1/IgG2 mediante un medio de sustitución para sustituir posiciones de la IgG2 en la región CH2 y/o CH3 por los aminoácidos de la IgG1 en posiciones en las que los dos isotipos difieren. Así, puede construirse un anticuerpo de IgG variante híbrido que comprenda uno o más medios de sustitución, por ejemplo, una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, - 236G (que indica una inserción de una glicina en la posición 236), y 327A.

#### 40 Modificaciones de glicofoma

Muchos polipéptidos, incluyendo los anticuerpos, se someten a una diversidad de modificaciones postraduccionales que implican a restos carbohidrato, tales como la glicosilación con oligosacáridos. Existen varios factores que pueden influir en la glicosilación. Se ha demostrado que la especie, el tejido y el tipo de célula son importantes en la forma en que se produce la glicosilación. Además, el entorno extracelular, a través de unas condiciones de cultivo alteradas, tales como la concentración de 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 posee una variedad diferenciada de estructuras de carbohidratos N-enlazadas. Además del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta 30% de las IgG humanas contienen una región Fab glicosilada. La IgG posee un único carbohidrato biantenarico N-enlazado en Asn297 del dominio CH2. Para la IgG del suero o producida *ex vivo* en hibridomas o células modificadas, las IgG son heterogéneas con respecto al carbohidrato enlazado en 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 restos externos.

Los restos carbohidrato de las inmunoglobulinas descritas en la presente se describirán remitiéndose a la nomenclatura que se emplea habitualmente para la descripción de oligosacáridos. Un análisis de la química de carbohidratos que usa esta nomenclatura se encuentra en Hubbard *et al.*, 1981, *Ann. Rev. Biochem.*, 50:555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal, que representa galactosa; Fuc, para la fucosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen mediante la anotación taquigráfica NeuNAc, para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNGc para el ácido 5-glicolilneuramínico.

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (carbohidratos que contienen dos o más azúcares simples unidos, por ejemplo, de dos a aproximadamente doce azúcares simples unidos) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacáridos generalmente se unen al esqueleto de la glicoproteína a través de N- u O-enlaces. Los oligosacáridos de las inmunoglobulinas descritas en la presente aparecen en general unidos a un dominio CH2 de una región Fc en forma de oligosacáridos N-enlazados. Una "glicosilación N-enlazada" se refiere a la unión del resto carbohidrato a un resto asparagina en una cadena de glicoproteína. Los expertos en la técnica reconocerán que, por ejemplo, cada uno de los dominios CH2 de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murina, así como de human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanas contiene un único sitio para la glicosilación N-enlazada en el resto aminoácido 297 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Para los fines de la presente, una "estructura de carbohidrato central madura" se refiere a una estructura de carbohidrato central procesada unida a una región Fc que en general consiste en la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc(fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)<sub>2</sub> típica de los oligosacáridos biantenarios. La estructura de carbohidrato central madura se une a la región Fc de la glicoproteína, en general a través de un N-enlace a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc. Un "GlcNAc bisectado" es un resto GlcNAc unido a la β1,4 manosa de la estructura de carbohidrato central madura. El GlcNAc bisectado puede unirse enzimáticamente a la estructura de carbohidrato central madura por medio de una enzima β(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). Las células CHO no expresan normalmente GnTIII (Stanley *et al.*, 1984, J. Biol. Chem., 261:13370-13378), pero pueden modificarse para que lo hagan (Umana *et al.*, 1999, Nature Biotech., 17:176-180).

En la presente se describen variantes de Fc que comprenden glicofomas modificadas. Una "glicofoma modificada", tal como se emplea en la presente, significa una composición de carbohidratos que están unidos covalentemente a una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, en la que dicha composición de carbohidratos se diferencia químicamente de la de una proteína originaria. Las glicofomas modificadas pueden ser útiles para una diversidad de fines, que incluyen, pero no se limitan a potenciar o reducir la función efectora mediada por FcγR. En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente se modifican para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectados que están unidos covalentemente a la región Fc.

En la técnica se conoce una diversidad de métodos para generar glicofomas modificadas (Umaña *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); documentos US 6.602.684; USSN 10/277.370; USSN 10/113.929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1; tecnología Potelligent™ [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de modificación de glicosilación GlycoMAb™ [GLYCART Biotechnology AG, Zürich, Suiza]).

Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectados que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, mediante la expresión de una IgG en diversos organismos o líneas celulares, modificada o no (por ejemplo, células Lec-13 CHO o células YB2/0 de hibridoma de rata), mediante la regulación de enzimas implicadas en la vía de la glicosilación (por ejemplo, FUT8 [α1,6-fucosiltransferasa] y/o β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o mediante la modificación de uno o más carbohidratos después de que la IgG se haya expresado. Otros métodos para modificar las glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen cepas glicomodificadas de levaduras (Li *et al.*, 2006, Nature Biotechnology, 24(2):210-215), musgos (Nechansky *et al.*, 2007, Mol. Immunol., 44(7):1826-1828), y plantas (Cox *et al.*, 2006, Nat. Biotechnol., 24(12):1591-1597). El uso de un método concreto para generar una glicofoma modificada no pretende limitar las realizaciones a ese método. Por el contrario, las realizaciones descritas en la presente incluyen variantes de Fc con glicofomas modificadas independientemente del modo en que se producen.

En una realización, las inmunoglobulinas descritas en la presente se glicomodifican para alterar el nivel de sialilación. Unos niveles más altos de glicanos de Fc sialilados en moléculas de inmunoglobulina G puede afectar de forma adversa a la funcionalidad (Scallon *et al.*, 2007, Mol. Immunol., 44(7):1524-1534), y la diferencias en los niveles de sialilación de Fc pueden producir 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 central de Fc, puede resultar ventajoso glicomodificar las inmunoglobulinas descritas en la presente para conseguir un contenido mayor o reducido en ácido siálico de Fc.

Una glicofoma modificada generalmente se refiere al carbohidrato u oligosacárido diferente; así, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma modificada. Como alternativa, una glicofoma modificada puede referirse a la inmunoglobulina que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente. En una realización, una composición descrita en la presente comprende un variante de Fc glicosilado que contiene una región Fc, en el que aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, por ejemplo, 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc., del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa. En otra realización, el anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa y comprende además al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En una realización alternativa, una composición comprende un variante de Fc glicosilado que contiene una región Fc, en el que aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100% del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de ácido siálico

y comprende además al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En otra realización, una composición comprende un variante de Fc glicosilado que contiene una región Fc, en el que aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100%, o 90-100% del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que contiene ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que contiene ácido siálico y comprende además al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En otra realización, la combinación de glicofoma modificada y modificación de aminoácido proporciona al anticuerpo unas propiedades de unión al receptor de Fc óptimas.

#### Otras modificaciones

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no están específicamente relacionadas con las funciones efectoras mediadas por FcγR o por el complemento *per se*. Estas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácidos, o pueden ser modificaciones que se realizan de modo enzimático o químico. Es probable que esta modificación o modificaciones proporcionen ciertas mejoras a la inmunoglobulina, por ejemplo, potencien su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. En la presente se describe una diversidad de mejoras que pueden realizarse acoplado las inmunoglobulinas descritas en la presente con modificaciones adicionales.

En una realización, la región variable de un anticuerpo descrito en la presente puede ser madurada por afinidad, es decir, 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. Estos tipos de modificaciones pueden mejorar la cinética de asociación y/o disociación para la unión al antígeno diana. Otras modificaciones incluyen las que mejoran la selectividad por el antígeno diana frente a dianas alternativas. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad por un antígeno expresado sobre células diana frente a células no diana. Pueden proporcionarse otras mejoras en las propiedades de reconocimiento de la diana mediante modificaciones adicionales. Estas propiedades pueden incluir, pero no se limitan a propiedades cinéticas específicas (concretamente, cinética de asociación y disociación), selectividad por la diana concreta frente a dianas alternativas, y selectividad por una forma específica de diana frente a formas alternativas. Los ejemplos incluyen la longitud completa frente a variantes de corte y empalme, formas en la superficie celular frente a formas solubles, selectividad por diversos variantes polimórficos, o selectividad por formas conformacionales específicas del antígeno diana. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan una internalización reducida o potenciada de la inmunoglobulina.

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

En otras realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente comprenden modificaciones que eliminan sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasas que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasas que degradan la proteína administrada *in vivo*. En una realización, se realizan modificaciones adicionales para retirar los sitios de degradación covalentes, tales como una desamidación (concretamente, la desamidación de restos glutamilo y asparaginilo para producir los correspondientes restos glutamilo y aspartilo), oxidación, y sitios de degradación proteolítica. Los sitios de desamidación que resulta particularmente útil retirar son los sitios que tienen una mayor propensión a la desamidación que incluyen, pero no se limitan a restos asparaginilo y glutamilo, seguido de glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En estos casos, la sustitución de cualquiera de los restos puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Los sitios de oxidación habituales incluyen restos metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes que pueden introducirse o retirarse incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Otras modificaciones también pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación y fosforilación N-enlazadas u O-enlazadas.

Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran la expresión y/o los rendimientos de purificación desde los hospedantes o células hospedantes que se emplean habitualmente para la producción de productos biológicos.

Estos incluyen, pero no se limitan a diversas líneas de células de mamífero (por ejemplo, CHO), líneas de células de levadura, líneas de células bacterianas y plantas. Otras modificaciones incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intercatenarios. Otras modificaciones incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracatenarios.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías descritas por Schultz *et al.*, que incluyen, pero no se limitan a los métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet., 20(12):625-630; Anderson *et al.*, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 101(2):7566-7571; Zhang *et al.*, 2003, 303(5656):371-373; y Chin *et al.*, 2003, Science, 301(5635):964-967. En algunas realizaciones, estas modificaciones permiten la manipulación de diversas propiedades funcionales, biofísicas, inmunológicas o de fabricación analizadas anteriormente. En otras realizaciones, estas modificaciones permiten otras modificaciones químicas para otros fines. En la presente se contemplan otras modificaciones. Por ejemplo, la inmunoglobulina puede conectarse a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Pueden realizarse otras modificaciones de aminoácidos para permitir la modificación postraduccional o química específica o no específica de las inmunoglobulinas. Estas modificaciones incluyen, pero no se limitan a la PEGilación y la glicosilación. Las sustituciones específicas que pueden utilizarse para permitir la PEGilación incluyen, pero no se limitan a la introducción de nuevos restos cisteína o aminoácidos no naturales, de modo que puedan usarse químicas de acoplamiento eficaces y específicas para unir un PEG u otro resto polimérico. La introducción de sitios de glicosilación específicos puede lograrse introduciendo nuevas secuencias N-X-T/S en las inmunoglobulinas descritas en la presente.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia originaria a proteínas del MHC. Por ejemplo, se modifican modificaciones de aminoácidos de modo que no existan, o exista un número mínimo de epítopos inmunológicos que se predice que se vayan a unir, con alta afinidad, a cualquier alelo de MHC prevalente. En la técnica se conocen varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en secuencias de proteínas, y estos pueden usarse para puntuar epítopos en un anticuerpo descritos en la presente. Véanse, por ejemplo, los documentos USSN 09/903.378, USSN 10/754.296, USSN 11/249.692, y las referencias citadas en ellos.

En algunas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden combinarse con inmunoglobulinas que alteran la unión a FcRn. Estos variantes pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas a las inmunoglobulinas. Los variantes preferidos 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, e incluyen, pero no se limitan, por ejemplo, a 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y, y 434M (documento PCT/US2008/088053, presentado el 22 de diciembre de 2008, titulado "Variantes de Fc con unión alterada a FcRn").

Otros 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 anticuerpos se incluyen dentro del alcance de las inmunoglobulinas descritas en la presente, y se realizan en general, pero no siempre, de modo postraduccional. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar restos aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C-terminales.

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los anticuerpos descritos en la presente comprende la adición de uno o más marcadores. La expresión "grupo marcador" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador se acopla con el anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversa longitud para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen diversos métodos para marcar proteínas y estos pueden usarse para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente.

#### Conjugados

En una realización, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente son "proteínas de fusión" de anticuerpos, a veces denominadas en la presente "conjugados de anticuerpo". El compañero de fusión o compañero de conjugado puede ser proteico o no proteico; este último en general se genera usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero de conjugado. Los compañeros de conjugado y de fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de molécula pequeña y polipéptidos. Por ejemplo, se describe una diversidad de conjugados de anticuerpos y métodos en Trail *et al.*, 1999, Curr. Opin. Immunol., 11:584-588.

Los posibles compañeros de conjugado incluyen, pero no se limitan a citoquinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina quinasas y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas realizaciones, los compañeros de conjugado pueden considerarse más como carga útil, es decir, el objetivo de un conjugado es el transporte dirigido del compañero de conjugado a una célula diana, por ejemplo, una célula de cáncer o una célula inmunológica, por la inmunoglobulina. Así, por ejemplo, la conjugación de una toxina a una inmunoglobulina dirige el transporte de dicha toxina a las células que expresan el antígeno diana. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, en realidad los conceptos y las definiciones de fusión y conjugado son solapantes. La denominación de una fusión o un conjugado no pretende limitarla a cualquier realización concreta descrita en la presente. Por el contrario, estos términos se emplean con bastante flexibilidad para transmitir el concepto amplio de que cualquier inmunoglobulina descrita en la presente puede enlazarse de modo genético, químico o de otro modo a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Los conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a marcadores tal como se describe 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 dichas toxinas. Las toxinas adecuadas y sus correspondientes fragmentos incluyen la cadena A de difteria, la cadena A de exotoxina, la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Los agentes citotóxicos también incluyen radioquímicos preparados conjugando radioisótopos con anticuerpos, o uniendo un radionúclido a un agente quelante que ha sido unido covalentemente al anticuerpo. Otras realizaciones utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, y duocarmicinas y análogos.

En una realización, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se condensan o conjugan con una citoquina. Una "citoquina", tal como se emplea en la presente, significa un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, tal como se describe en Penichet *et al.*, 2001, J. Immunol. Methods, 248:91-101, las citoquinas pueden condensarse con un anticuerpo para proporcionar una gama de propiedades deseables. Los ejemplos de estas citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento, tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como la hormona estimulante del folículo ("follicle stimulating hormone", FSH), hormona estimulante del tiroides ("thyroid stimulating hormone", TSH), y hormona luteinizante ("luteinizing hormone", LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral-alfa y -beta; sustancia inhibidora de mulleriano; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes ("transforming growth factors", TGF), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento similar a la insulina-I y -II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias ("colony stimulating factors", CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-1 alfa, 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, que incluyen LIF y ligando de kit ("kit ligand", KL). Tal como se emplea en la presente, el término citoquina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o procedentes de un cultivo de células recombinantes, y los equivalentes biológicamente activos de citoquinas de secuencia nativa.

En otra realización, una molécula de coacoplamiento descrita en la presente puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el pretransporte dirigido a tumor, en el que el conjugado de inmunoglobulina-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente de eliminación, y después se administra un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido). En una realización alternativa, la inmunoglobulina se conjuga o se une operablemente a una enzima para emplear una terapia de profármacos mediada por enzimas dependiente de anticuerpos ("Antibody Dependent Enzyme Mediated Prodrug Therapy", ADEPT). La ADEPT puede usarse conjugando o uniendo operablemente la inmunoglobulina a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo).

Cuando se emplea compañeros de inmunoglobulina como conjugados, los compañeros de conjugado pueden enlazarse a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en la presente, incluyendo a los N- o C-terminales, o a otro resto entre los terminales. Puede usarse una diversidad de conectores en las inmunoglobulinas descritas en la presente para unir covalentemente compañeros de conjugado a una inmunoglobulina. Un "conector", "secuencia de conector", "espaciador", "secuencia de sujeción" o sus equivalentes gramaticales, en la presente significa una molécula o grupo de moléculas (tales como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y que a menudo actúa para colocar las dos moléculas en una configuración. Los conectores son conocidos en la técnica; por ejemplo, los conectores homo- o heterobifuncionales son muy conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticulantes, pp. 155-200). Puede usarse una serie de estrategias para unir covalentemente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a conexiones de polipéptidos entre los N- y C-terminales de proteínas o dominios de proteínas, conexión a través de enlaces disulfuro, y conexión a través de reactivos reticulantes químicos. En un aspecto de esta realización, el conector es un enlace peptídico, generado

mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El conector peptídico puede incluir predominantemente los siguientes restos aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El conector peptídico debe tener una longitud que sea adecuada para conectar dos moléculas de tal forma que asuman la configuración correcta entre sí de manera que conserven la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este fin incluyen al menos uno y no más de 50 restos aminoácidos. En una realización, el conector tiene una longitud de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos, por ejemplo, un conector puede tener una longitud de 1 a 20 aminoácidos. Los conectores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)<sub>n</sub>, (GSSGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:1), (GGGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:2), y (GGGS)<sub>n</sub> (indicado como SEQ ID NO:3), en los que n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, y otros conectores flexibles, tal como apreciarán los expertos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse como conectores una diversidad de polímeros no proteicos que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol.

#### Producción de moléculas de coacoplamiento

En la presente también se describen métodos para producir y ensayar experimentalmente las moléculas de coacoplamiento. Los métodos descritos no pretenden limitar las realizaciones a ninguna aplicación concreta o teoría de funcionamiento. Por el contrario, los métodos proporcionados pretenden ilustrar en general que una o más inmunoglobulinas pueden producirse y ensayarse experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales para la biología molecular, la expresión, la purificación y la selección de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel y Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5:683-689; Maynard y Georgiou, 2000, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 2:339-376; *Antibodies: A Laboratory Manual*, por Harlow y Lane, Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En una realización descrita en la presente, se crean ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coacoplamiento, y después pueden clonarse en células hospedantes, expresarse y ensayarse, si se desea. Así, pueden prepararse ácidos nucleicos y, en particular, ADN, que codifiquen cada secuencia de proteína. Estas prácticas se realizan usando procedimientos muy conocidos. Por ejemplo, puede usarse una diversidad de métodos para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente, según se describe en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3ª ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, la generación de secuencias exactas para un banco que comprende un gran número de secuencias es potencialmente caro y largo. Un "banco" en la presente significa un conjunto de variantes en cualquier forma, que incluyen, pero no se limitan a una lista de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, una lista de sustituciones de ácidos nucleicos o aminoácidos en posiciones variables, un banco físico que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias del banco, o un banco físico que comprende las proteínas variantes, en forma purificada o no purificada. Por consiguiente, existe una diversidad de técnicas que pueden usarse para generar con eficacia los bancos descritos en la presente. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a métodos de ensamblaje de genes, métodos basados en PCR y métodos que usan variaciones de la PCR, métodos basados en la reacción de cadena de ligasa, métodos de oligos reunidos, tales como los que se emplean en la reordenación sintética, métodos de amplificación propensa a errores y métodos que emplean oligos con mutaciones aleatorias, métodos de mutagénesis dirigida a sitio clásicos, mutagénesis de módulos, y otros métodos de amplificación y síntesis de genes. Tal como se conoce en la técnica, existe una diversidad de kits disponibles en el mercado y métodos para el ensamblaje de genes, la mutagénesis, la subclonación de vectores y similares, y dichos productos comerciales se emplean para generar ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden producirse cultivando una célula hospedante transformada con un ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica las moléculas de coacoplamiento, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán según la elección del vector de expresión y la célula hospedante, y los expertos en la técnica podrán determinarlas con facilidad mediante la experimentación habitual. Puede usarse una amplia diversidad de células hospedantes apropiadas que incluyen, pero no se limitan a células de mamífero, bacterias, células de insecto y levaduras. Por ejemplo, una diversidad de líneas celulares que pueden usarse para generar las inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en el catálogo de líneas celulares de ATCC®, disponible en the American Type Culture Collection.

En una realización, las moléculas de coacoplamiento se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, que incluyen sistemas en los que se introducen construcciones de expresión en las células de mamífero usando virus, tales como retrovirus o adenovirus. Puede usarse cualquier célula de mamífero, por ejemplo, células humanas, de ratón, rata, hámster y primate. Las células adecuadas también incluyen células para investigación conocidas que incluyen, pero no se limitan a células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NS0 y sus variantes. En una realización alternativa, las proteínas del banco se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacterianos son muy conocidos en la técnica e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*. En realizaciones alternativa, 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.). En una realización alternativa, las moléculas de coacoplamiento se expresan *in vitro* usando sistemas de traducción sin células. Están disponibles sistemas de traducción *in vitro* derivados de

células procariotas (por ejemplo, *E. coli*) y eucariotas (por ejemplo, germen de trigo, reticulocitos de conejo) y estos pueden elegirse basándose en los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, tal como apreciarán los expertos en la técnica, es necesaria la traducción *in vitro* para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, la presentación de ribosomas. Además, las inmunoglobulinas pueden producirse por medio de métodos de síntesis química, y también con sistemas de expresión transgénicos en animales (por ejemplo, leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insecto enteras, etc.) y plantas (por ejemplo, maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.)

Los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar la proteína. Puede utilizarse una diversidad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en el genoma de un hospedante. Los vectores de expresión se construyen para que sean compatibles con el tipo de célula hospedante. Así, los vectores de expresión que se emplean en la generación de las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a los vectores que permiten la expresión de proteínas en células de mamífero, bacterias, células de insecto, levaduras y en sistemas *in vitro*. Tal como se conoce en la técnica, está disponible una diversidad de vectores de expresión, en el mercado o de otro modo, que pueden usarse para expresar las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente.

Los vectores de expresión generalmente comprenden una proteína unida operablemente a secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier compañero de fusión y/u otros elementos. "Unido operablemente", en la presente, significa que el ácido nucleico está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. En general, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operablemente al ácido nucleico que codifica la molécula de coacoplamiento, y generalmente son apropiados para la célula hospedante usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir secuencias de promotores, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y fin de la transcripción, secuencias de inicio y fin de la traducción, y secuencias de potenciadores o activadores. Tal como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión generalmente contienen un gen de selección o marcador para permitir la selección de células hospedantes transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son muy conocidos en la técnica y varían según la célula hospedante usada.

Las moléculas de coacoplamiento pueden estar unidas operablemente a un compañero de fusión que permite el transporte dirigido, la purificación, la selección, la presentación y similares de la proteína expresada. Los compañeros de fusión pueden estar enlazados a la secuencia de inmunoglobulina a través de secuencias de conectores. La secuencia de conector en general comprenderá un pequeño número de aminoácidos, generalmente menos de diez, aunque también pueden usarse conectores más largos. Generalmente, las secuencias de conector se seleccionan para que sean flexibles y resistentes a la degradación. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, puede usarse como conector cualquiera de una amplia diversidad de secuencias. Por ejemplo, una secuencia de conector habitual comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia señal o de transporte dirigido que dirige la inmunoglobulina y cualquier compañero de fusión asociado hacia una localización celular deseada o hacia el medio extracelular. Tal como se conoce en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigir a una proteína para que sea segregada hacia el medio de crecimiento o hacia el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o una proteína que permite la purificación y/o la selección. Dichos compañeros de fusión incluyen, pero no se limitan a marcadores de polihistidina (marcadores de His) (por ejemplo, H<sub>6</sub> and H<sub>10</sub> u otros marcadores que se emplean en los sistemas de cromatografía de afinidad de metales inmovilizados ("Immobilized Metal Affinity Chromatography", IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad de Ni<sup>+2</sup>)), fusiones de GST, fusiones de MBP, marcador de estreptavidina, la secuencia diana de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA, y marcadores de epitopo que son la diana de anticuerpos (por ejemplo, marcadores c-myc, marcadores flag y similares). Tal como apreciarán los expertos en la técnica, estos marcadores pueden ser útiles para la purificación, para la selección o ambas. Por ejemplo, una inmunoglobulina puede purificarse usando un marcador de His inmovilizándolo a una columna de afinidad de Ni<sup>+2</sup> y posteriormente, después de la purificación, el mismo marcador de His puede usarse para inmovilizar el anticuerpo a una placa revestida con Ni<sup>+2</sup> para realizar un ELISA u otro ensayo de unión (tal como se describe a continuación). Un compañero de fusión puede permitir el uso de un método de selección para seleccionar inmunoglobulinas (véase a continuación). Los compañeros de fusión que permiten realizar una diversidad de métodos de selección son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, condensando los miembros de un banco de inmunoglobulinas a 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). Los compañeros de fusión permiten marcar las inmunoglobulinas. Como alternativa, un compañero de fusión puede unirse a una secuencia específica sobre el vector de expresión, permitiendo que el compañero de fusión y la inmunoglobulina asociada se unan de modo covalente o no covalente al ácido nucleico que los codifica. Los métodos para introducir un ácido nucleico exógeno en células hospedantes son muy conocidos en la técnica, y variarán según la célula hospedante utilizada. Las técnicas incluyen, pero no se limitan a transfección mediada por dextranos, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio,

transfección medada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección vírica o por fagos, encapsulación de uno o más polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamífero, la transfección puede ser transitoria o estable.

5 En una realización, las moléculas de coacoplamiento se purifican o se aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse mediante una diversidad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación convencionales incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen el intercambio iónico, la interacción hidrófoba, la afinidad, la filtración en gel o según el tamaño, y la fase inversa, realizadas a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas, tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y cromatoenfoco. También son útiles las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con la concentración de las proteínas. Tal como se conoce en la técnica, una diversidad de proteínas naturales se unen a Fc y a los anticuerpos, y estas proteínas pueden usarse para la purificación de las inmunoglobulinas descritas en la presente. Por ejemplo, las proteínas A y G bacterianas se unen a la región Fc. De modo similar, la proteína L bacteriana se une a la región Fab de algunos anticuerpos, al igual que, por supuesto, el antígeno diana del anticuerpo. La purificación a menudo puede lograrse mediante un compañero de fusión concreto. Por ejemplo, las inmunoglobulinas pueden purificarse usando una resina de glutatión si se emplea una fusión de GST, una cromatografía de afinidad de Ni<sup>+2</sup> si se emplea un marcador de His, o un anticuerpo antimarcador inmovilizado si se emplea un marcador. Para unas directrices generales sobre las técnicas de purificación adecuadas, véase, por ejemplo, *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, que se incorpora como referencia en su totalidad. El grado de purificación necesario variará dependiendo de la selección o del uso de las inmunoglobulinas. En algunos casos no es necesaria la purificación. Por ejemplo, en una realización, si las inmunoglobulinas se segregan, la selección puede realizarse directamente desde el medio. Tal como se conoce en la técnica, algunos métodos de selección no implican la purificación de las proteínas. Así, por ejemplo, si un banco de inmunoglobulinas se transforma en un banco de presentación de fagos, la purificación de las proteínas puede no realizarse.

#### 25 Experimentación *in vitro*

Las moléculas de coacoplamiento puede seleccionarse usando una diversidad de métodos que incluyen, pero no se limitan a los que emplean ensayos *in vitro*, *in vivo* y ensayos basados en células, y tecnologías de selección. Pueden utilizarse tecnologías de selección automáticas y de alta capacidad de procesamiento en los procedimientos de selección. La selección puede usar un compañero de fusión o marcador. El uso de los compañeros de fusión se ha analizado anteriormente. "Marcado" en la presente significa que las inmunoglobulinas descritas en la presente contienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una selección. En general, los marcadores se incluye en tres clases: a) marcadores inmunológicos, que pueden ser un epitopo incorporado como compañero de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados, y c) marcadores de molécula pequeña, que pueden incluir tintes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas, tales como biotina, que permiten usar otros métodos de marcaje. Los marcadores pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición, y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de las proteínas.

En una realización, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las moléculas de coacoplamiento se seleccionan en un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* pueden permitir un amplio intervalo dinámico para seleccionar propiedades de interés. Las propiedades que pueden seleccionarse incluyen, pero no se limitan a la estabilidad, la solubilidad y la afinidad por ligandos de Fc, por ejemplo, FcγR. Pueden seleccionarse múltiples propiedades de modo simultáneo o individual. Las proteínas pueden purificarse o no purificarse, dependiendo de los requisitos del ensayo. En una realización, la selección es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para la unión de moléculas de coacoplamiento a una proteína o una molécula no proteica que se sabe o se cree que se une a la molécula de coacoplamiento. En una realización, la selección es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. En una realización alternativa, la selección es un ensayo para la unión de moléculas de coacoplamiento a un ligando de Fc, que incluye, pero no se limita a la familia de FcγR, el receptor neonatal FcRn, la proteína del complemento C1q, y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos de Fc proceden de seres humanos, ratones, ratas, conejos y/o monos. Los ensayos de unión pueden realizarse usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a ensayos basados en FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer", transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y BRET ("Bioluminescence Resonance Energy Transfer", transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), AlphaScreen™ (ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado), ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), SPR ("Surface Plasmon Resonance", resonancia de plasmón de superficie, también conocido como BIACORE®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel, y cromatografía, que incluye filtración en gel. Estos y otros métodos pueden aprovechar algún compañero de fusión o marcador de la inmunoglobulina. Los ensayos pueden emplear una diversidad de métodos de detección que incluyen, pero no se limitan a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos.

60 Las propiedades biofísicas de las moléculas de coacoplamiento, por ejemplo, estabilidad y solubilidad, pueden ensayarse usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de las proteínas puede determinarse midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desplegado. Por ejemplo, las

moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden desplegarse usando un desnaturalizante químico, calor o pH, y esta transición puede controlarse empleando métodos que incluyen, pero no se limitan a espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de RMN, calorimetría, y proteólisis. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos de las transiciones de plegamiento y desplegamiento también pueden controlarse usando estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural global de una molécula de coacoplamiento pueden determinarse cuantitativa o cualitativamente usando una amplia gama de métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos que pueden usarse para caracterizar las propiedades biofísicas de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente incluyen electroforesis en gel, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar, cromatografía, tal como cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, cartografiado de péptidos, cartografiado de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbancia de ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, proteólisis, y reticulación, medición de la turbidez, ensayos de retraso de filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión de un tinte fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopía, y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. También puede usarse un análisis estructural que emplea técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de RMN. En una realización, la estabilidad y/o la solubilidad pueden medirse determinando la cantidad de disolución de proteínas después de un periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede o no estar expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo, una temperatura elevada, un pH bajo o la presencia de un desnaturalizante. Debido a que la función generalmente 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 puede ensayarse para su capacidad para unirse al antígeno diana, después exponerse a una temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos, y después ensayarse de nuevo para la unión al antígeno. Debido a que no se espera que una proteína desplegada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la cantidad de actividad remanente proporciona una medición de la estabilidad y la solubilidad de la molécula de coacoplamiento.

En una realización, las moléculas de coacoplamiento pueden ensayarse usando uno o más ensayos basados en células o *in vitro*. Para estos ensayos, las inmunoglobulinas, purificadas o no purificadas, generalmente se añaden de modo exógeno, de modo que las células se exponen a variantes individuales o grupos de variantes que pertenecen a un banco. Estos ensayos generalmente, pero no siempre, se basan en la biología de la capacidad de la inmunoglobulina para unirse al antígeno diana y mediar en algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo, funciones efectoras, tales como la lisis celular, la fagocitosis, la inhibición de la unión al ligando/receptor, la inhibición del crecimiento y/o proliferación, la apoptosis y similar. Estos ensayos a menudo implican controlar la respuesta de las células a la inmunoglobulina, por ejemplo, la supervivencia de las células, la muerte de las células, la fagocitosis celular, la lisis de las células, el cambio en la morfología celular, o la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o un gen indicador. Por ejemplo, estos ensayos pueden medir la capacidad de las moléculas de coacoplamiento para suscitar la ADCC, ADCP, o CDC. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir otras células o componentes, es decir, además de las células diana, por ejemplo, complemento del suero, o células efectoras, tales como monocitos de sangre periférica ("peripheral blood monocytes", PBMC), células NK, macrófagos y similares. Estas células adicionales pueden proceder de cualquier organismo, por ejemplo, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los anticuerpos reticulados o monoméricos pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan el antígeno diana del anticuerpo, o pueden mediar en el ataque a las células diana por células inmunológicas que se han añadido al ensayo. Los métodos para controlar la muerte o la viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de tintes, fluoróforos, reactivos inmunquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de caspasa o los fluoroconjugados de anexina pueden permitir la medición de la apoptosis y la captación o liberación de sustratos radiactivos (por ejemplo, ensayos de liberación de cromo-51) o la reducción metabólica de tintes fluorescente, tales como azul de alamar, pueden permitir controlar el crecimiento, la proliferación o la activación de células. En una realización, se emplea el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA the DELFIA® (Perkin Elmer, MA). Como alternativa, 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 actuar como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede controlarse ensayando proteínas o genes naturales que puedan estar sobrerregulados o infrarregulados, por ejemplo, puede medirse la liberación de ciertas interleuquinas o, como alternativa, la lectura puede realizarse a través de una luciferasa o una construcción de GFP-indicador. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medición de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una inmunoglobulina. Los tipos de células para estos ensayos pueden ser procariontas o eucariotas, y puede emplearse una diversidad de líneas celulares que son conocidas en la técnica. Como alternativa, las selecciones basadas en células se realizan empleando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican moléculas de coacoplamiento.

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; unos intervalos de actividades, tales como >100x de mejora o >100x de reducción, mezclan la activación del receptor y los resultados del ensayo esperados de dichos perfiles de receptores.

Experimentación *in vivo*

Las propiedades biológicas de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden caracterizarse en experimentos con células, tejidos y organismos completos. Tal como se conoce en la técnica, los fármacos a menudo se ensayan en animales que incluyen, pero no se limitan a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia del fármaco para un tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, la toxicidad y otras propiedades del fármaco. Dichos animales pueden denominarse modelos de enfermedad. Con respecto a las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente, surge un problema concreto cuando se emplean modelos animales para evaluar el potencial para la eficacia en seres humanos de polipéptidos candidatos; esto es debido, al menos en parte, al hecho de que las moléculas de coacoplamiento que tienen un efecto específico sobre la afinidad por un receptor de Fc humano pueden o no tener un efecto de afinidad similar con el receptor animal ortólogo. Estos problemas pueden exacerbarse por las inevitables ambigüedades asociadas con la correcta asignación de ortólogos verdaderos (Mechetina *et al.*, Immunogenetics, 2002, 54:463-468), y al 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 poseen). Los productos terapéuticos a menudo se ensayan en ratones que incluyen, pero no se limitan a las razas de ratón NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y transgénicos (que incluyen activados e inactivados). Estos ratones pueden desarrollar diversos trastornos autoinmunológicos que se parecen a patologías de enfermedad inflamatorias, autoinmunológicas sistémicas o específicas de órgano humanas, tales como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, una inmunoglobulina descrita en la presente prevista para enfermedades autoinmunológicas puede ensayarse en estos modelos de ratón tratando los ratones para determinar la capacidad de la inmunoglobulina para reducir o inhibir el desarrollo de la patología de enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el sistema de receptor de Fc de ratón y humano, una estrategia alternativa consiste en usar un modelo de SCID murino, en el que los ratones inmunológicamente deficientes reciben un injerto de PBL o PBMC humanos (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) que proporcionan un sistema inmunológico humano semifuncional con células efectoras humanas y receptores de Fc. En este modelo, una exposición al antígeno (tal como el toxoide del tétanos) activa las células B para que se diferencien en células plasmáticas y segreguen inmunoglobulina, reconstituyendo así una inmunidad humoral específica de antígeno. Por tanto, una inmunoglobulina de transporte dirigido dual descrita en la presente que se une específicamente a IgE y FcγRIIb sobre células B puede ensayarse para estudiar la capacidad de inhibir específicamente la diferenciación de células B. Estos experimentos pueden proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha inmunoglobulina para ser usada como producto terapéutico. También pueden usarse otros organismos, por ejemplo, mamíferos, para los ensayos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, así, pueden usarse para ensayar la eficacia, la toxicidad, la farmacocinética u otras propiedades de las inmunoglobulinas descritas en la presente. En último término, son necesarios ensayos de las inmunoglobulinas descritas en la presente en seres humanos para su aprobación como fármacos y, por supuesto, se contemplan estos experimentos. Así, las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden ensayarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden conferir una mejor actuación a productos terapéuticos que contienen Fc en modelos animales o en seres humanos. Los perfiles de unión al receptor de dichas inmunoglobulinas, tal como se describen en esta memoria descriptiva, pueden seleccionarse, por ejemplo, para aumentar la potencia de fármacos citotóxicos o para dirigirse a funciones efectoras o células efectoras específicas para mejorar la selectividad de la acción del fármaco. Además, pueden seleccionarse perfiles de unión al receptor que puedan reducir algunas o todas las funciones efectoras, reduciendo con ello los efectos secundarios o la toxicidad de dicho fármaco que contiene Fc. Por ejemplo, puede seleccionarse una inmunoglobulina con unión reducida a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa para eliminar la mayor parte de las funciones efectoras mediadas por células, o puede seleccionarse una inmunoglobulina con unión reducida a C1q para limitar las funciones efectoras mediadas por el complemento. En algunos contextos, se sabe que dichas funciones efectoras tienen efectos tóxicos potenciales. Por tanto, su eliminación puede aumentar la seguridad del fármaco que porta Fc, y esta seguridad mejorada puede caracterizarse en modelos animales. En algunos contextos, se sabe que dichas funciones efectoras median en la actividad terapéutica deseable. Por tanto, su potenciación puede aumentar la actividad o la potencia del fármaco que porta Fc, y esta actividad o potencia mejorada puede caracterizarse en modelos animales.

En algunas realizaciones, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden evaluarse para la eficacia en modelos animales clínicamente pertinentes de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos pertinentes incluyen diversos animales transgénicos para antígenos y receptores específicos.

Los modelos transgénicos pertinentes, tales como los que expresan receptores de Fc humanos (por ejemplo, CD32b) pueden usarse para evaluar y ensayar inmunoglobulinas y fusiones de Fc para determinar su eficacia. La evaluación de las moléculas de coacoplamiento mediante la introducción de genes humanos que median directa o indirectamente en una función efectora en ratones u otros roedores puede permitir realizar estudios fisiológicos de la eficacia en trastornos autoinmunológicos y AR. Los receptores de Fc humanos, tales como FcγRIIb, pueden poseer polimorfismos, tales como los que aparecen en el promotor del gen (-343 desde G a C) o el dominio transmembrana del receptor 187 I o T, que también permitirían la introducción de combinaciones específicas de polimorfismos humanos en roedores. Los diversos estudios que implican FcR específicos de polimorfismo no se limitan a esta sección, sino que incluyen todos los análisis y aplicaciones de los FcR en general, según se especifica a lo largo de

- esta solicitud. Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden conferir una actividad superior a fármacos que contienen Fc en estos modelos transgénicos, en particular los variantes con perfiles de unión optimizados para una actividad mediada por FcγRIIb humano pueden mostrar una actividad superior en ratones CD32b transgénicos. Pueden observarse unas mejoras similares en la eficacia en ratones transgénicos para los otros receptores de Fc humanos, por ejemplo, FcγRIIa, FcγRI, etc., para las moléculas de coacoplamiento con perfiles de unión optimizados para los respectivos receptores. Los ratones transgénicos para múltiples receptores humanos mostrarán una actividad mejorada para las inmunoglobulinas con perfiles de unión optimizados para los correspondientes múltiples receptores.
- Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el empleo de modelos animales para caracterizar la eficacia potencial de anticuerpos terapéuticos candidatos en un paciente humano, algunos polipéptidos variantes descritos en la presente pueden usarse como delegados para evaluar la eficacia potencial en seres humanos. Estas moléculas delegadas puede imitar (en el sistema animal) a la biología del FcR y/o del complemento de una correspondiente inmunoglobulina humana candidata. Es más probable que esta imitación se manifieste mediante afinidades de asociación relativas entre inmunoglobulinas específicas y receptores animales frente a receptores humanos. Por ejemplo, si se emplea un modelo de ratón para evaluar la eficacia potencial en seres humano de un variante de Fc que presenta afinidad reducida por el FcγRIIb humano inhibitorio, un variante delegado apropiado tendría una afinidad reducida por el FcγRII de ratón. También debe advertirse que los variantes de Fc delegados pueden crearse en el contexto de un variante de Fc humano, un variante de Fc animal o ambos.
- En una realización, el ensayo de las moléculas de coacoplamiento puede incluir el estudio de la eficacia en primates (por ejemplo, modelo de mono cynomolgus) para facilitar la evaluación de la depuración de células diana específicas que portan el antígeno diana. Otros modelos de primate incluyen, pero no se limitan al uso del mono rhesus para evaluar polipéptidos de Fc en estudios terapéuticos de enfermedades autoinmunitarias, trasplante y cáncer.
- Se realizan estudios de toxicidad para determinar los efectos relacionados con el anticuerpo o la fusión de Fc que no pueden evaluarse con los perfiles de farmacología convencionales o que aparecen solo después de la administración repetida del agente. La mayoría de los ensayos de toxicidad se realizan en dos especies (un roedor y un no roedor) para asegurarse de que cualquier efecto adverso inesperado no sea pasado por alto antes de introducir nuevas entidades terapéuticas en el ser humano. En general, estos modelos pueden medir una diversidad de toxicidades, que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductora/del desarrollo y carcinogenicidad. Dentro de los parámetros mencionados anteriormente se incluyen la medición convencional del consumo de alimentos, peso corporal, formación de anticuerpos, química clínica y examen macro- y microscópico de órganos/tejidos convencionales (por ejemplo, cardiotoxicidad). Otros parámetros de medición son el traumatismo en el sitio de inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si aparecen. Habitualmente, los productos terapéuticos de anticuerpos monoclonales, desnudos o conjugados, se evalúan para la reactividad cruzada con tejidos normales, la inmunogenicidad/producción de anticuerpos, toxicidad del conjugado o conector, y toxicidad de "espectador" de especies radiomarcadas. No obstante, dichos estudios deben individualizarse para solucionar los problemas específicos y siguiendo las directrices establecidas por ICH S6 (estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también indicados anteriormente). Así, los principios generales consisten en que los productos estén suficientemente bien caracterizados, se hayan retirado las impurezas/contaminantes, que el material de ensayo sea comparable a lo largo del desarrollo, y que se mantenga la adherencia a GLP.
- La farmacocinética (PK) de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente puede estudiarse en una diversidad de sistemas animales, siendo los más pertinentes los primates no humanos, tales como los monos cynomolgus y rhesus. Unas administraciones únicas o repetidas i.v./s.c. a lo largo de un intervalo de dosis de 6000 veces (0,05-300 mg/kg) pueden evaluarse para la semivida (días a semanas) usando la concentración plasmática y la eliminación. También puede medirse el volumen de distribución en estado estable y el nivel de absorción sistémica. Los ejemplos de dichos parámetros de medición en general incluyen la concentración plasmática máxima observada (C<sub>max</sub>), el tiempo hasta alcanzar la C<sub>max</sub> (T<sub>max</sub>), el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el momento 0 hasta el infinito [AUC(0-inf)] y la semivida de eliminación aparente (T<sub>1/2</sub>). Otros parámetros medidos pueden incluir el análisis compartimentalizado de los datos de concentración-tiempo obtenidos después de la administración i.v. y la biodisponibilidad.
- Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden conferir una mejor farmacocinética a productos terapéuticos que contienen Fc en modelos animales o en seres humanos. Por ejemplo, una mayor unión a FcRn puede aumentar la semivida y la exposición al fármaco que contiene Fc. Como alternativa, una menor unión a FcRn puede disminuir la semivida y la exposición al fármaco que contiene Fc en los casos en los que una exposición reducida sea favorable, tales como cuando dicho fármaco tiene efectos secundarios.
- En la técnica se sabe que la gama de receptores de Fc se expresan de modo diferente en diversos tipos de células inmunológicas, así como en diferentes tejidos. La distribución tisular diferente de los receptores de Fc puede afectar, en último término, a las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente. Debido a que las moléculas de coacoplamiento de la presentación tienen afinidades variables por la gama de receptores de Fc, una posterior selección de los polipéptidos para propiedades PD y/o PK puede ser muy útil para definir el equilibrio óptimo de PD, PK, y eficacia terapéutica conferidos por cada polipéptido candidato.

Los estudios de farmacodinámica pueden incluir, pero no se limitan al transporte dirigido a células específicas o el bloqueo de los mecanismos de señalización, la medición de la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno, etc. Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden dirigirse a poblaciones de células efectoras concretas y, por tanto, pueden dirigir fármacos que contienen Fc para inducir ciertas actividades para mejorar la potencia o para aumentar la penetración hacia un compartimento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad y la localización de neutrófilos pueden ser determinadas por una molécula de coacoplamiento que se dirige a FcγRIIIb. Estos efectos farmacodinámicos pueden demostrarse en modelos animales o en seres humanos.

#### Uso

Tras ser preparadas, las moléculas de coacoplamiento, según se describen en la presente, pueden usarse en una diversidad de métodos. En una realización preferida, el método incluye poner en contacto una célula que coexpresa IgE y FcγRIIb con una molécula de coacoplamiento, de modo que IgE y FcγRIIb se unen a la molécula de coacoplamiento y la célula es inhibida. "Inhibir", en este contexto, significa que la molécula de coacoplamiento previene o reduce la activación y/o la proliferación de células B IgE+.

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden usarse en una amplia gama de productos. En una realización, una molécula de coacoplamiento descrita en la presente es un reactivo terapéutico, de diagnóstico o de investigación. Las moléculas de coacoplamiento pueden usarse en una composición que sea monoclonal o policlonal. Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden usarse para fines terapéuticos. Tal como apreciarán los expertos en la técnica, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden usarse para cualquier fin terapéutico para el cual puedan emplearse anticuerpos y similares. Las moléculas de coacoplamiento pueden administrarse a un paciente para tratar trastornos que incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas y cáncer.

Un "paciente", para los objetivos descritos en la presente, incluye seres humanos y otros animales, por ejemplo, otros mamíferos. Así, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente tienen aplicaciones de terapia humana y veterinarias. El término "tratamiento" o "tratar", tal como se describe en la presente, pretende incluir el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o supresoras para una enfermedad o un trastorno. Así, por ejemplo, una administración con éxito de una molécula de coacoplamiento antes de la aparición de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración con éxito de una molécula de coacoplamiento optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" y "tratar" también incluyen la administración de una inmunoglobulina optimizada después de la aparición de la enfermedad para erradicar la enfermedad. La administración con éxito de un agente después de la aparición y después de que se hayan desarrollado síntomas clínicos, con la posible mitigación de los síntomas clínicos y, quizás, la mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "que necesitan tratamiento" incluyen mamíferos que ya padecen la enfermedad o el trastorno, así como aquellos propensos a padecer la enfermedad o el trastorno, incluyendo aquellos en los que el trastorno o la enfermedad debe prevenirse.

En una realización, una molécula de coacoplamiento descrita en la presente se administra a un paciente que padece una enfermedad que implica la expresión inapropiada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance descrito en la presente se pretenden incluir enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes, debidas, por ejemplo, a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, la localización de proteínas, la modificación postraduccional, el estado conformacional, la presencia de una proteína de patógeno o mutante, etc. De modo similar, la enfermedad o el trastorno pueden caracterizarse por alteraciones en moléculas que incluyen, pero no se limitan a polisacáridos y gangliósidos. La sobreabundancia puede ser debida a cualquier causa que incluye, pero no se limita a la sobreexpresión a nivel molecular, una aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción, o la mayor actividad de una proteína con relación al estado normal. Se incluyen dentro de esta definición enfermedades y trastornos caracterizados por la reducción de una proteína. Esta reducción puede ser debida a cualquier causa que incluye, pero no se limita a una expresión reducida a nivel molecular, una aparición acortada o reducida en el sitio de acción, formas mutantes de una proteína, o la actividad reducida de una proteína con relación al estado normal. Esta sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse con relación a la expresión, aparición o actividad normales de una proteína, y dicha medición puede desempeñar un papel importante en el desarrollo y/o ensayo clínico de las inmunoglobulinas descritas en la presente.

En la presente se describen nuevos métodos para tratar trastornos mediados por IgE, por ejemplo, alergias alimentarias y ambientales y asma alérgico. En realizaciones preferidas, las enfermedades alérgicas que pueden tratarse por medio de los productos y métodos de la invención incluye asma alérgico y atópico, dermatitis atópica y eccema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, y choque anafiláctico. Las alergias ambientales y alimentarias que pueden tratarse incluyen alergias a los ácaros del polvo, cucarachas, gatos y otros animales, polen (que incluye ambrosía, grama, barrilla de borde, roble, centeno y otros), mohos y hongos (por ejemplo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* y otros), látex, picaduras de insecto (abeja, avispa y otros), penicilina y otros fármacos, fresas y otras frutas y verduras, cacahuetes, soja y otras legumbres, nueces y otros frutos secos, marisco y otros alimentos marinos, leche y otros productos lácteos, trigo y otros cereales, y huevos. En efecto, cualquier alérgeno alimentario, aereoalérgeno, alérgeno laboral u otro alérgeno ambiental mediado por IgE puede tratarse mediante una cantidad terapéutica de los productos descritos en esta

invención. Para conocer ejemplos de alérgenos habituales, 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).

5 También se describen ensayos de diagnóstico para identificar pacientes que es probable que muestren una respuesta clínica favorable a una molécula de coacoplamiento descrita en la presente, o que es probable que muestren una respuesta significativamente mejor cuando se tratan con una molécula de coacoplamiento descrita en la presente frente a uno o más productos terapéuticos usados en la actualidad. Puede emplearse cualquiera de una serie de métodos conocidos en la técnica para determinar los polimorfismos de FcγR en seres humanos. Además, también se describen ensayos de pronóstico realizados en muestras clínicas, tales como muestras de sangre y  
10 tejido. Estos ensayos pueden evaluar la actividad, independientemente del mecanismo. Esta información puede usarse para identificar pacientes para su inclusión o exclusión de ensayos clínicos, o para informar de decisiones con respecto a dosificaciones y regímenes de tratamiento apropiados. Esta información también puede usarse para seleccionar un fármaco que contenga una molécula de coacoplamiento concreta que muestra una actividad superior en dicho ensayo.

#### 15 Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que una molécula de coacoplamiento descrita en la presente y uno o más agentes terapéuticamente activos se formulan. Las formulaciones de moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se preparan para su conservación mezclando dichas inmunoglobulinas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales  
20 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, acetato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, butil  
25 orbenzil alcohol; alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (menos que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros  
30 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; cargas, tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes ligantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o  
35 tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una realización, la composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina descrita en la presente puede estar en una forma hidrosoluble, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, que pretenden incluir sales de adición de ácidos y bases. Una "sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales que conservan la eficacia biológica de las bases libres y que no son indeseables desde el punto de vista biológico u otro,  
40 formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metansulfónico, ácido etansulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables" incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio. Algunas realizaciones incluyen al menos una de las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio.  
45 Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas, que incluyen aminas sustituidas naturales, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, y etanolamina. Las formulaciones para ser usadas para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra con facilidad mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

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

La molécula de coacoplamiento y otros agentes terapéuticamente activos también pueden encerrarse en microcápsulas preparadas mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina, o microcápsulas de poli(metacrilato de metilo)), sistemas de transporte de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones. Estas técnicas se describen en  
60

Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. ed., 1980.

5 Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, y dichas 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-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), poli-D-(-)-ácido 3-hidroxi-butírico, y ProLease® (disponible en el mercado en Alkermes), que es un sistema de transporte basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólido (PLG).

#### Administración

15 La administración de la composición farmacéutica que comprende una molécula de coacoplamiento descrita en la presente, por ejemplo, en forma de una disolución acuosa estéril, puede realizarse de una diversidad de formas que incluyen, pero no se limitan a la vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, bálsamos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal, o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la inmunoglobulina puede aplicarse directamente como una disolución o pulverizado. Tal como se conoce en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse en consecuencia dependiendo de la manera de introducción.

20 Puede utilizarse la administración subcutánea en casos en los que el paciente puede autoadministrarse la composición farmacéutica. Muchos productos terapéuticos de proteínas no son lo suficientemente potentes como para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente eficaz en el volumen máximo aceptable para la administración subcutánea. Este problema puede solucionarse en parte mediante el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina, y polisorbato. Los anticuerpos descritos en la presente pueden adaptarse bien a la administración subcutánea debido, por ejemplo, a su mayor potencia, semivida en suero mejorada o solubilidad potenciada.

25 Tal como se conoce en la técnica, los productos terapéuticos de proteínas a menudo se administran mediante una infusión o dosis en embolada IV. Los anticuerpos descritos en la presente también pueden administrarse usando dichos métodos. Por ejemplo, la administración puede ser una infusión intravenosa con cloruro de sodio al 0,9% como vehículo de infusión.

30 La administración pulmonar puede lograrse usando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente formador de aerosol. Por ejemplo, puede emplearse la tecnología inhalable AERx® disponible en el mercado en Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance™ disponible en el mercado en Nektar Therapeutics. Los anticuerpos descritos en la presente pueden adaptarse bien a la administración intrapulmonar. El FcRn está presente en el pulmón, y puede estimular el transporte desde el pulmón hacia la corriente sanguínea (por ejemplo, Syntonix, documento WO 04004798, Bitonti *et al.* (2004) Proc. Nat. Acad. Sci., 101:9763-9768). Por consiguiente, los anticuerpos que se unen a FcRn con más eficacia en el pulmón o que se liberan con más eficacia en la corriente sanguínea pueden presentar una mejor biodisponibilidad tras la administración intrapulmonar. Los anticuerpos descritos en la presente también pueden adaptarse bien a la administración intrapulmonar debido, por ejemplo, a su solubilidad mejorada o punto isoeléctrico alterado.

40 Además, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden adaptarse bien a la administración oral debido, por ejemplo, a su estabilidad mejorada a pH gástrico y mayor resistencia a la proteólisis. Además, parece que el FcRn se expresa en el epitelio intestinal de adultos, de modo que los anticuerpos descritos en la presente con unos perfiles de interacción con FcRn mejorados muestran una mejor biodisponibilidad tras la administración oral. El transporte mediado por FcRn de anticuerpos también puede producirse en otras membranas mucosas, tales como las de los tractos gastrointestinal, respiratorio y genital.

45 Además, en la técnica se conocen una serie de sistemas de administración y estos pueden usarse para administrar los anticuerpos descritos en la presente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a la encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (por ejemplo, microesferas de PLA/PGA), y similares. Como alternativa, puede usarse un implante de material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluyen membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o matriz, tales como poliésteres, hidrogeles, poli(alcohol vinílico), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, tales como Lupron Depot®, y poli-D-(-)-ácido 3-hidroxi-butírico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina descrita en la presente, por ejemplo, mediante infección retroviral, inyección directa, o revestimiento con lípidos, receptores de la superficie celular u otros agentes de transfección. En todos los casos, los sistemas de liberación controlada pueden usarse para liberar la inmunoglobulina en la localización de acción deseada o cerca de esta.

#### Dosificación

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración se seleccionan, en una realización, para que sean

terapéutica o profilácticamente eficaces. Tal como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de proteínas, la administración sistémica frente a localizada, y la tasa de nueva síntesis de proteasas, así como la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el momento de la administración, la interacción del fármaco y la gravedad del trastorno, y estos podrán ser determinados por los expertos en la técnica por medio de la experimentación habitual.

La concentración de la molécula de coacoplamiento terapéuticamente activa en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 al 100% en peso. En una realización, la concentración de la molécula de coacoplamiento se encuentra en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Para tratar un paciente, puede administrarse una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina descrita en la presente. Una "dosis terapéuticamente eficaz" en la presente significa una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del objetivo del tratamiento y los expertos en la técnica podrán determinarla con facilidad usando técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o mayores, por ejemplo, 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal. En una realización, las dosificaciones varían de 1 a 10 mg/kg.

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

En otras realizaciones, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente se administran en regímenes de dosificación metronómicos, mediante una infusión continua o una administración frecuente sin periodos largos de descanso. Esta administración metronómica puede implicar una dosificación a intervalos constantes sin periodos de descanso. Generalmente, dichos regímenes incluyen una infusión a baja dosis crónica o continua durante un periodo largo de tiempo, por ejemplo, 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses, o hasta 6 meses o más. El uso de dosis menores puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de periodos de descanso.

En ciertas realizaciones, las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente una vez, un segundo agente una segunda vez, opcionalmente otros agentes en otros momentos, opcionalmente un periodo de descanso, y después la repetición de esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos generalmente es de 2-10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

#### Terapias de combinación

Las moléculas de coacoplamiento descritas en la presente pueden administrarse concomitantemente con uno o más regímenes o agentes terapéuticos distintos. Los regímenes o agentes terapéuticos distintos pueden usarse para tratar la misma enfermedad, para tratar una complicación acompañante o pueden usarse para mejorar la eficacia o la seguridad de la inmunoglobulina.

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

Las terapias de la invención pueden combinarse con fármacos antiinflamatorios no esteroideos ("non-steroidal anti-inflammatory drugs", NSAID), tales como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, indometacina, cetorolaco, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno, y nabumetona. Las coterapias pueden incluir antihistaminas, tales como loratadina, fexofenadina, cetirizina, difenhidramina, maleato de clorfeniramina, clemastina, y azelastina. La coterapia puede incluir cromoglicato, cromolina sodio, y nedrocromilo, así como descongestionantes, pulverizados u orales, tales como oximetazolina, fenilefrina, y pseudoefedrina. Las terapias de la invención pueden combinarse con una clase de antiinflamatorios denominada antagonistas del receptor de leucotrienos, tales como pranlukast, zafirlukast, y montelukast, e inhibidores de la síntesis del receptor de leucotrienos, tales como zileutón.

Las terapias de la invención pueden combinarse con otras inmunoterapias, que incluyen inyecciones para la alergia,

así como otros antagonistas de IgE o FcεR. Las terapias de la invención pueden combinarse con antagonistas de quimioquinas o citoquinas que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos y fusiones de Fc, que incluyen, pero no se limitan a inhibidores de las quimioquinas 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 la adhesión, factores de transcripción y/o señalización intracelular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la invención pueden combinarse con moduladores de NF-kb, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFAT, supresores de la señalización de citoquinas ("suppressors of cytokine signaling", SOCS), receptores activados por el proliferador de peroxisomas ("peroxisome proliferator-activated receptors", PPAR), MAP quinasa, p38 MAPK, JNK, y receptores de esfingosina 1-fosfato. Las terapias de la invención pueden administrarse con tolilato de suplastat, inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE4), bloqueantes del canal de calcio y moléculas similares a la heparina. Las posibles coterapias para la invención se describen con más detalle en Caramori *et al.*, 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 3-S1-S6.

Las terapias de la invención también pueden usarse junto con uno o más antibióticos, agentes antifúngicos o agentes antivíricos. Los anticuerpos descritos en la presente también pueden combinarse con otros regímenes terapéuticos, tales como cirugía.

### Ejemplos

A continuación se proporcionan ejemplos solo para fines ilustrativos. Estos ejemplos no pretenden limitar ninguna de las realizaciones descritas en la presente a ninguna aplicación o teoría de funcionamiento concretas.

#### Ejemplo 1: Nuevos métodos para inhibir células IgE+ FcγRIIb+

La inmunoglobulina IgE es un iniciador y propagador fundamental de la respuesta alérgica en un tejido afectado. La IgE se une al receptor de alta afinidad por IgE (FcεRI), un receptor clave implicado en las manifestaciones alérgicas inmediatas que se expresa sobre una diversidad de células efectoras, que incluyen células cebadas, basófilos, eosinófilos, así como otros tipos de células. La reticulación de FcεRI por alérgeno-IgE inmunocomplejados activa estas células, que liberan mediadores químicos, tales como histamina, prostaglandinas y leucotrienos, que pueden conducir al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad de tipo I. El anticuerpo monoclonal aprobado omalizumab (Xolair) neutraliza la IgE uniéndose a ella y bloqueando el acoplamiento con FcεR. El omalizumab reduce la IgE bioactiva a través del secuestro, atenuando la cantidad de IgE específica de antígeno que pueden unirse y sensibilizar a células cebadas de tejidos y basófilos. Esta neutralización de la IgE libre en la circulación, a su vez, conduce a una disminución en los síntomas de las enfermedades alérgicas. De manera interesante, los niveles de IgE en suero aumentan después del inicio de la terapia debido a la formación de un complejo de omalizumab-IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. Por consiguiente, esta situación puede conducir a falsos negativos en ensayos de diagnóstico y, por tanto, los niveles de IgE deben comprobarse a menudo.

Una nueva estrategia que se dirige a la vía de IgE implica no solo el bloqueo de la IgE libre en circulación para su acoplamiento a FcεR sobre células efectoras, sino que se dirige a la fuente de la producción de IgE. La IgE es segregada por células plasmáticas que producen IgE localizadas en los nodos linfáticos que drenan el sitio de entrada del antígeno o localmente en los sitios de las reacciones alérgicas. Las células plasmáticas que producen IgE se diferencian a partir de células B IgE+. El cambio de clase de las células B a la producción de IgE es inducida por dos señales distintas, y ambas pueden ser proporcionadas por células TH2.

Existen dos formas de inmunoglobulinas: la forma segregada y la forma anclada a la membrana. La forma anclada a la membrana se diferencia de la forma segregada porque la primera contiene un péptido de anclaje a la membrana que se extiende desde el C-terminal de la cadena pesada. La inmunoglobulina anclada a la membrana sobre células B, también denominada complejo de receptor de células B ("B cell receptor", BCR), es crucial para las funciones de las células B. Puede transducir señales para que células B en reposo se diferencien en linfoblastos activados y células plasmáticas que segregan Ig.

Las células B diferenciadas que expresan IgE anclada a la membrana, denominadas en la presente células B mIgE+, poseen un mecanismo de retroalimentación de regulación negativa natural, el receptor de Fc inhibitorio FcγRIIb. El FcγRIIb se expresa sobre una diversidad de células inmunológicas, que incluyen células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos, en donde desempeña un papel crucial en la regulación inmunológica. En su papel normal sobre células B, el FcγRIIb actúa como un mecanismo de retroalimentación para modular la activación de células B a través del receptor de células B (BCR). La unión de BCR a un antígeno inmunocomplejado sobre células B maduras activa una cascada de señalización intracelular, que incluye la movilización del calcio, que conduce a la proliferación y la diferenciación celular. Sin embargo, puesto que se producen anticuerpos de IgG con especificidad por el antígeno, los inmunocomplejos ("immune complexes", IC) asociados pueden reticular el BCR con el FcγRIIb, tras lo cual se inhibe la activación del BCR por el acoplamiento del FcγRIIb y las vías de señalización intracelulares asociadas que interfieren con las vías corriente abajo de la activación de BCR. La expresión de FcγRIIb sobre la superficie de células B mIgE+, que emplean mIgE como su BCR, actúa como regulador negativo de estos tipos de células.

Una nueva estrategia para inhibir una enfermedad mediada por IgE, ilustrada en la figura 1, consiste en inhibir las células B IgE+ (es decir, células B que expresan IgE anclada a la membrana) mediante el coacoplamiento de la IgE anclada a la membrana y el receptor inhibitorio FcγRIIb. En las células B que han cambiado de clase para expresar IgE, mIgE actúa como el BCR (denominado en la presente mIgE BCR). Esta estrategia potencialmente imitaría el mecanismo biológico natural de la supresión mediada por inmunocomplejos de la activación de células B, evitando con ello la diferenciación en células plasmáticas que producen IgE. Las células plasmáticas que producen IgE residen en la médula ósea y probablemente tienen un periodo de vida de varias semanas a varios meses. Puesto que las nuevas células plasmáticas que segregan IgE atraviesan los estadios de células B que expresan mIgE durante la diferenciación, si su generación se abroga mediante la inhibición de sus precursores de células B mIgE+ con este tratamiento anti-IgE, las células plasmáticas existentes irían muriendo dentro de semanas a meses y, por tanto, la producción de IgE gradualmente disminuiría. De manera importante, la inhibición de las células B de memoria IgE+, que portan mIgE, también sería inhibida por las inmunoglobulinas anti-IgE que se coacoplan con FcγRIIb con alta afinidad. Si esto sucede, la terapia puede tener un impacto a largo plazo sobre la enfermedad fundamental.

15 Ejemplo 2: Anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb

Bajo condiciones fisiológicas, la desviación del BCR por FcγRIIb y la posterior supresión de células B se produce a través de inmunocomplejos de IgG y el antígeno cognado. La estrategia de diseño consistió en reproducir este efecto usando un único anticuerpo reticulante. 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 la IgG inmunocomplejada, pero no monomérica. Se razonó que la alta afinidad por este receptor (menor que 100 nM) sería necesaria para la máxima inhibición de la activación de células B. Para potenciar la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE de la invención, la región Fc se modificó con variantes que mejoran la unión al FcγRIIb. Se han descrito variantes de Fc modificados que se unen a FcγRIIb con mayor afinidad, con relación a la IgG1 nativa (documento USSN 12/156.183, presentado el 30 de mayo de 2008, titulado "Métodos y composiciones para inhibir células que expresan CD32b").

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

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

Los variantes se ensayaron para la afinidad por el receptor usando la tecnología Biacore, también denominada en la presente Biacore, una tecnología basada en la resonancia de plasmón de superficie ("surface plasmon resonance", SPR) para estudiar las interacciones biomoleculares a tiempo real. Las mediciones de SPR se realizaron usando un instrumento Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). Se generó un chip biodetector CM5 de proteína A/G (Pierce Biotechnology) (Biacore) usando un protocolo de acoplamiento de amina primaria convencional. Todas las mediciones se realizaron usando tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005% en vol/vol, Biacore). Se inmovilizaron anticuerpos a 20 nM o 50 nM en tampón HBS-EP sobre la superficie de proteína A/G y se inyectaron los FcγR. Después de cada ciclo, la superficie se regeneró inyectando tampón glicina (10 mM, pH 1,5). Los datos se procesaron estableciendo un tiempo y respuesta cero antes de la inyección de FcγR y restando las señales no específicas apropiadas (respuesta al canal de referencia e inyección del tampón de tránsito). Se realizaron análisis cinéticos mediante un ajuste global de los datos de unión con un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el programa informático BIAevaluation (Biacore).

Se muestra un conjunto representativo de sensogramas para la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes seleccionados al FcγRIIb en la figura 2. Las afinidades de todos los variantes de IgG1 y WT (nativa) por todos los FcγR, obtenidas a partir de ajustes de los datos de unión de Biacore, se representan gráficamente en la figura 3 y se proporcionan en forma numérica en la figura 4. Mientras que Fc de WT IgG1 se une a FcγRIIb con afinidad de μM ( $K_D = 1,8 \mu M$  en la figura 4), una serie de variantes, por ejemplo, G236D/S267E, S239D/S267E y S267E/L328F, que han sido modificados se unen al receptor inhibitorio con más fuerza. El variante S239D/I332E, tal como se describe en el documento USSN 11/124.620, también tiene mayor afinidad por los receptores activantes FcγRIIa y FcγRIIIa y, por tanto, es capaz de mediar en una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) potenciadas. El variante G236R/L328R, también denominado Fc-inactivado o

Fc-KO, carece de unión a los receptores de Fc, y se emplea como control en los experimentos descritos en la presente.

Se construyeron variantes seleccionados de anticuerpos que se dirigen a IgE. Las regiones variables de cadena pesada y ligera (VH y VL) de los anticuerpos anti-IgE se proporcionan en la figura 5. El omalizumab es un anticuerpo humanizado que, en la actualidad, ha sido aprobado para el tratamiento del asma alérgico, y se comercializa con el nombre Xolair. MaE11 es el precursor murino del 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 han sintetizado en el mercado (Blue Heron Biotechnologies). También se han sintetizado los genes de VH y VL de la región variable del anticuerpo antiviral sincitial respiratorio ("respiratory syncytial virus", RSV) motavizumab, usado en los experimentos descritos en la presente como control negativo. Los genes de VL se subclonaron en el vector de expresión de mamífero pTT5 (NRC-BRI, Canadá) que codifica la cadena constante Ckappa. Los genes de VH se subclonaron en el vector pTT5 que codifica la IgG1 nativa y cadenas constantes variantes. Las secuencias de aminoácidos de cadenas constantes seleccionadas se proporcionan en la figura 6. Todo el ADN se secuenció para confirmar la fidelidad de las secuencias. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de longitud completa de anticuerpos seleccionados se proporcionan en la figura 7.

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

Los anticuerpos anti-IgE de IgG1 nativa y variante se ensayaron para la unión 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 usados, se sintetizó (Blue Heron Biotechnologies) y se subclonó en el vector pTT5. El Fc de IgE se expresó en células 293E y se purificó usando proteína A como se describió anteriormente. Se realizaron las mediciones de SPR usando el método de captura de anticuerpos/proteína A descrito anteriormente, excepto que el analito era FcγRIIb o la región Fc de IgE. La adquisición de los datos y el ajuste se realizaron como se describió anteriormente. La figura 8 proporciona las constantes de unión en equilibrio resultantes ( $K_D$ ) obtenidas a partir de estos experimentos de unión, así como la afinidad en número de veces con relación a la IgG1 nativa para la unión a FcγRIIb. La figura 9 muestra las gráficas de estos datos. Los resultados confirman la alta afinidad de los anticuerpos por IgE, y que el variante S267E/L328F mejora la unión a FcγRIIb en más de dos órdenes de magnitud, lo cual resulta coherente con los resultados previos.

El uso de variantes concretas, por ejemplo, S267E/L328F y S239D/I332E, pretende constituir en la presente un estudio demostrativo preliminar del mecanismo según se describe en la presente, y no pretende limitar la invención a su uso particular. Los datos proporcionados en los documentos USSN 12/156.183 y USSN 11/124.620 indican que una serie de variantes modificados, en posiciones de Fc específicas, proporcionan las propiedades buscadas. Las sustituciones para potenciar la afinidad por FcγR, en particular por FcγRIIb, incluyen: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, y 332. En algunas realizaciones, se realizan sustituciones en al menos una o más de las siguientes posiciones no limitantes para potenciar la afinidad por FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268, y 328.

Las combinaciones no limitantes de posiciones para realizar sustituciones para potenciar la afinidad por 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. En algunas realizaciones, las combinaciones de posiciones para realizar sustituciones para potenciar la afinidad por FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a las siguientes: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268, y 267/328.

Las sustituciones para potenciar la afinidad por 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. En algunas realizaciones, las combinaciones de posiciones para realizar sustituciones para potenciar la afinidad por FcγRIIb incluyen, pero no se limitan a las siguientes: 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, y 328Y.

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

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

Se estableció un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas ("enzyme-linked immunosorbent assay", ELISA) para detectar la IgE. Se prepararon placas de fondo plano revistiéndolas con tampón bicarbonato de Na, pH 9,4, seguido de la adherencia con anticuerpos de captura anti-IgE a 10 ug/ml durante la noche en pH 9,4 (tampón bicarbonato de Na 0,1 M). Después de una noche, la placa se bloqueó con BSA al 3%/PBS, y se añadieron diluciones en serie de IgE (procedentes de un kit de ELISA de IgE humana, Bethyl Laboratories) 3x hasta 1 ug/ml. Después de 3 horas, las placas se lavaron 3x (200 ul) con TTBS y se midió la IgE unida. Se añadió un anticuerpo anti-IgE humana policlonal de cabra conjugado con HRP (Bethyl Laboratories) a 1:5000 durante 1 hora en BSA al 1%/PBS. Las muestras se lavaron 3x y se detectó la IgE con sustrato de TMB peroxidasa (KPL, Inc 50-76-00). Las reacciones se detuvieron con 50 ul de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y se leyeron a 450 nm.

La figura 10 muestra la captura de IgE con diversos anticuerpos anti-IgE humana, que incluye una reunión de tres anticuerpos anti-IgE monoclonales (MabTech; 107/182/101), MaE11\_IgG1\_G236R/L328R, y omalizumab\_IgG1\_G236R/L328R. Los datos demuestran que el reactivo de anticuerpo anti-IgE del mercado (MabTech), omalizumab, y su anticuerpo quimérico originario MaE11 son capaces de capturar la IgE. Para usar este ensayo para detectar la IgE, es necesario determinar si los anticuerpos MaE11 y omalizumab interfieren con la captura de IgE por el reactivo anti-IgE MabTech. El ensayo se repitió como se describió anteriormente, y se calculó la concentración de IgE a partir de la absorbancia usando una curva patrón. La figura 11 muestra que el anticuerpo anti-IgE omalizumab\_G236R/L328R no compite con el anticuerpo anti-IgE MabTech en el presente protocolo de ELISA.

Se ensayaron anticuerpos anti-IgE de variantes de Fc para su capacidad para inhibir células B IgE+. Se indujeron PBMC humanas para que cambiaran de clase a células B productoras de IgE añadiendo 5 ng/ml de interleuquina-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 tanto, imita la actividad del coactivador CD40L. Se añadieron concentraciones variables de los anticuerpos anti-IgE, y las muestras se incubaron durante 12 días. Se prepararon placas de ELISA y se bloquearon como se describió anteriormente usando 5 ug/ml de Mabtech anti-IgE como anticuerpo de captura. Se añadieron 100 ul de las muestras de PBMC y se incubaron durante >3 horas, y después se lavaron con TTBS 3x (200 ul). Se añadió el anticuerpo conjugado con HRP y se detectó como se describió anteriormente. La absorbancia a 450 nm se convirtió en concentración de IgE usando una curva patrón. Los resultados se muestran en la figura 12. Los anticuerpos que carecen de unión a FcγR (variantes de G236R/L328R) o que no presentan especificidad por IgE (anticuerpo anti-RSV motavizumab) no produjeron ningún efecto sobre la producción de IgE a partir de células B diferenciadas. Por contraste, los anticuerpos variantes con mayor afinidad por FcγRIIb inhiben la producción de IgE. Estos datos sugieren que el coacoplamiento de la IgE superficial y el receptor FcγR inhibitorio FcγRIIb inhibe a las células B cambiadas de clase de este tipo de inmunoglobulina. La inhibición de las células B IgE+ reduce el número de células plasmáticas que expresan IgE lo cual, a su vez, reduce la cantidad de IgE detectada. Para evaluar la selectividad de esta actividad para células B que producen IgE, se midió la IgG2 humana de las mismas muestras usando un ELISA de IgG2 (Bethyl Laboratories). La figura 13 demuestra que la secreción de IgG2 no fue inhibida, lo cual indica que la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb es selectiva para las células cambiadas de clase IgE+. La repetición de este experimento usando versiones variantes del anticuerpo anti-IgE aprobado omalizumab mostró resultados inhibitorios similares con el variante de 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 estimulación de mIgE BCR. El anterior ensayo se repitió, con el cambio de clase a IgE estimulado por un anticuerpo agonista de α-CD40 e IL-4 y, además, las células B se activaron usando un anticuerpo anti-mu o anti-CD79b. Estos anticuerpos reticulan el BCR, proporcionando con ello una señal similar al antígeno inmunocomplejado. El anticuerpo anti-mu reticula la IgM anclada a la membrana, y el anti-CD79b reticula a CD79b, que es un componente señalizador del complejo de BCR. Se incubaron PBMC durante 14 días con IL-4, α-CD40, y anti-CD79b o anti-mu, y se detectó la IgE como se describió anteriormente. Los resultados para anti-CD79b (figura 15) y anti-mu (figura 16) demuestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb son capaces de inhibir la producción de IgE cuando las células B se estimulan a través de la reticulación de BCR.

Una estrategia adicional para inhibir las células B IgE+ es depurarlas. Esto puede realizarse usando un anticuerpo anti-IgE que está potenciado para la función efectora. El variante S239D/I332E aumenta la unión a los receptores activantes FcγRIIa y FcγRIIIa (figura 3 y figura 4) y, por tanto, mejora las funciones efectoras de ADCC y ADCP. El anterior ensayo de células B se realiza usando un variante de S239D/I332E del anticuerpo anti-IgE omalizumab. Se incubaron PBMC durante 14 días con IL-4, α-CD40, y anti-CD79b (figura 17) o anti-mu (figura 18), y se detectó la IgE como se describió anteriormente. Los resultados (figuras 17 y 18) demuestran que los anticuerpos anti-IgE con función efectora optimizada son capaces de inhibir la producción de IgE desde células B IgE+ de clase cambiada.

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

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se evaluaron usando un modelo de ratón huPBL-SCID como delegado para la actividad terapéutica en seres humanos. Este estudio estudia la capacidad de los anticuerpos anti-IgE descritos en la presente para inhibir la actividad de célula B y el desarrollo de células plasmáticas en respuesta a un alérgeno humano habitual, la proteína del ácaro del polvo Der p 1. En este método, leucocitos de sangre

periférica humanos ("peripheral blood leukocytes", PBL) procedentes de un donante de sangre con respuesta alérgica a Der p 1 se injertaron en ratones SCID inmunodeficientes y se trataron con anticuerpos anti-IgE nativos o variantes. Los ratones se expusieron a un antígeno para estimular una respuesta inmunológica, y se midió la producción de inmunoglobulinas para estudiar el desarrollo de células B en células plasmáticas.

5 Los donantes de sangre se seleccionaron para la alergia al antígeno del ácaro del polvo basándose en la presencia de anticuerpos anti-IgE contra Der p 1. Un donante con reactividad positiva se sometió a leucaféresis para obtener células mononucleares de sangre periférica ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC). El protocolo de este estudio se proporciona en la figura 20. Un día antes de la inyección de las PBMC, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) con 100  $\mu$ l de anticuerpo anti-asialo GM (Wako, Richmond, VA) para depurar las células asesinas naturales ("natural killer", NK) murinas. Al día siguiente, los ratones recibieron una inyección i.p. de  $3 \times 10^7$  PBL en un volumen de 0,5 ml. Después de la inyección de las 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 las PBMC, se recolectó sangre de todos los ratones a través de una punción retro-orbital sinus/plexus (OSP) para la determinación de los niveles de IgG e IgE humanas mediante ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dos días después (días 9), los ratones recibieron una inyección i.p. de 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. En el día 11, los ratones recibieron una inyección i.p. de 15  $\mu$ g del antígeno del 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 el antígeno), se recolectó sangre de todos los ratones para la determinación de los anticuerpos de IgG e IgE humana. En el mismo día, los ratones recibieron una segunda inyección i.p. de 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. Dos días después (día 25), los ratones recibieron una vacunación de refuerzo i.p. de 10  $\mu$ g del antígeno del ácaro del polvo Der p 1. En el día 37 (12 días después del refuerzo con el antígeno), se recolectó sangre mediante OSP para la determinación de la inmunoglobulina humana. Se midieron las concentraciones de IgG e IgE humanas usando métodos ELISA similares a los descritos anteriormente.

Los resultados se muestran en las figuras 20 y 21 para los niveles de IgG e IgE en suero, respectivamente. Antes de la exposición al alérgeno, los niveles de anticuerpos de IgG e IgE humanas eran bajos en todos los grupos. Después de la inmunización con Der p 1, todos los grupos mostraron niveles elevados de IgG humana, lo cual indica una respuesta inmunológica robusta por las células B humanas injertadas frente al antígeno Der p 1 vacunado o a antígenos de ratón endógenos. Por contraste con la respuesta de IgG, los grupos de tratamiento se diferenciaron significativamente en su producción de anticuerpos de IgE. El omalizumab y la versión de IgG1 de H1L1 MaE11 fueron equivalentes al vehículo en su capacidad para inhibir la producción de IgE humana. Sin embargo, la versión potenciada para Fc $\gamma$ RIIb (IIbE, S267E/L328F) de H1L1 MaE11 no mostró niveles detectables de IgE humana. La versión de Fc-KO (variante G236R/L328R) de H1L1 MaE11, que carece de unión a todos los Fc $\gamma$ R, mostró una potenciación en la producción de IgE humana. Esto probablemente es debido a su capacidad para reticular la mIgE humana y, así, activar las células B IgE<sup>+</sup>, a pesar de su falta completa de actividades con Fc $\gamma$ RIIb inhibitorio o Fc $\gamma$ RIIIa/IIIa citotóxicos, tales como la que poseen las versiones de IgG1 e IIbE del anticuerpo. Estos datos *in vivo* demuestran que los anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por Fc $\gamma$ RIIb son capaces de inhibir la activación de células B IgE<sup>+</sup> humanas y la diferenciación de células plasmáticas que segregan inmunoglobulinas y, así, apoyan el potencial de las inmunoglobulinas descritas en la presente para tratar trastornos mediados por IgE.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Nuevas composiciones y métodos para tratar trastornos mediados por IgE

<130> 067461-5143-WO

<140> PCT/US2009/057366  
<141> 17-09-2009

<150> US 61/097.819  
<151> 17-09-2008

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 742 419 T3

<223> VH de omalizumab humanizado

<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

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

10 <400> 2  
 Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp  
 1 5  
 <210> 3  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 3  
 Thr Tyr Asp Gly Ser  
 1 5  
 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 4  
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val  
 1 5 10  
 <210> 5  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> VL de omalizumab humanizado

<400> 5

ES 2 742 419 T3

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

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

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

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
65 70 75 80  
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His  
85 90 95

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

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

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

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

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

<210> 8  
<211> 7  
<212> PRT  
20 <213> *Mus musculus*

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

<210> 9  
<211> 121  
<212> PRT  
25 <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

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

ES 2 742 419 T3

Lys Asn Arg Ile Ser Val Thr Arg Asp Thr Ser Gln Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Asn Ser Ala Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> *Mus musculus*  
 <400> 10  
 Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp  
 1 5  
 <210> 11  
 10 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 11  
 Thr Tyr Asp Gly Ser  
 1 5  
 <210> 12  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20 <400> 12  
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val  
 1 5 10  
 <210> 13  
 <211> 111  
 25 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 13  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 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  
 30

ES 2 742 419 T3

<210> 14  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 5 <400> 14  
                   Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr  
                   1                  5                  10  
 <210> 15  
 <211> 7  
 10 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 15  
                   Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser  
                   1                  5  
 15 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20 <400> 16  
                   Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr  
                   1                  5  
 <210> 17  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> VH de HIL1MaE11 humanizado  
 30 <400> 17  
                   Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
                   1                  5                  10                  15  
                   Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
                   20                  25                  30  
                   Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp  
                   35                  40                  45  
                   Ile Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
                   50                  55                  60  
                   Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
                   65                  70                  75                  80  
                   Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
                   Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly  
                   100                  105                  110  
                   Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                  120  
 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 35 <213> *Mus musculus*  
 <400> 18

ES 2 742 419 T3

Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp  
 1 5  
 <210> 19  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 5 <213> *Mus musculus*  
 <400> 19  
 Thr Tyr Asp Gly Ser  
 1 5  
 <210> 20  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 20  
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val  
 1 5 10  
 <210> 21  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 20 <400> 21  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
 20 25 30  
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser Glu Ile Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His  
 85 90 95  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 <210> 22  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 22  
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr  
 1 5 10  
 <210> 23  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 23  
 Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser  
 1 5  
 <210> 24  
 <211> 7  
 <212> PRT

ES 2 742 419 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 24

5 <210> 25  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 <400> 26

Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp  
 1 5

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

20 <400> 27

Ser Pro Gly Thr Phe Thr  
 1 5

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

25 <400> 28

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

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

30 <400> 28

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

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

35 <400> 28

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

ES 2 742 419 T3

<400> 29

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
 20 25 30  
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asp Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Asn Ile Asn Ser Val Glu Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asp Ser Trp Pro Thr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 30

Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
 1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

10

<400> 31

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser  
 1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 32

Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr  
 1 5

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

25

<400> 33

30

ES 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 330

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 34

ES 2 742 419 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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 35

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

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 2 742 419 T3

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

<210> 36

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

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

10 <400> 36

ES 2 742 419 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 2 742 419 T3

245

250

255

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

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

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

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

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

<210> 37

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante artificial de cadena ligera (VH-C) de omalizumab

10 <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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 38

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante artificial de cadena pesada de IgG1 de omalizumab

10 <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 2 742 419 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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 39

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Humanizado artificial de cadena pesada S267E/L328F de omalizumab

10 <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 2 742 419 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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 40

<211> 218

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Humanizado artificial de cadena ligera (VH-C) H1L1 MaE11

10 <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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 41

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Humanizado artificial de cadena pesada de IgG1 H1L1 MaE11

10 <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 2 742 419 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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
450

<210> 42

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Humanizado artificial de cadena pesada H1L1 MaE11 S267E/L328F

10 <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 2 742 419 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 2 742 419 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 450

- <210> 43
- <211> 5
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Conector de glicina-serina
- 10 <400> 43
- gsggs 5
- <210> 44
- <211> 5
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Conector de glicina-serina
- 20 <400> 44
- ggggs 5
- <210> 45
- <211> 4
- <212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Conector de glicina-serina
- 30 <400> 45
- gggs 4

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un anticuerpo anti-IgE que comprende:  
una cadena pesada variable que consiste en SEQ ID NO:17;  
una cadena ligera variable que consiste en SEQ ID NO:21; y
- 5 una región Fc variante que comprende al menos una modificación de aminoácido comparada con una región Fc originaria, y en el que dicha modificación de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en S267E y S267E/L328F, según el índice de EU, y en el que la región Fc originaria es una IgG humana.
- 2.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que la región Fc originaria es una IgG1 humana.
- 3.- El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha modificación comprende S267E.
- 10 4.- El anticuerpo de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicha modificación comprende S267E/L328F.
- 5.- Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 6.- Una célula hospedante que comprende un ácido nucleico de la reivindicación 5.
- 7.- Un método para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 6 y recuperar el anticuerpo a partir del cultivo celular.
- 15 8.- Un anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento del asma alérgico en un paciente.

Figura 1

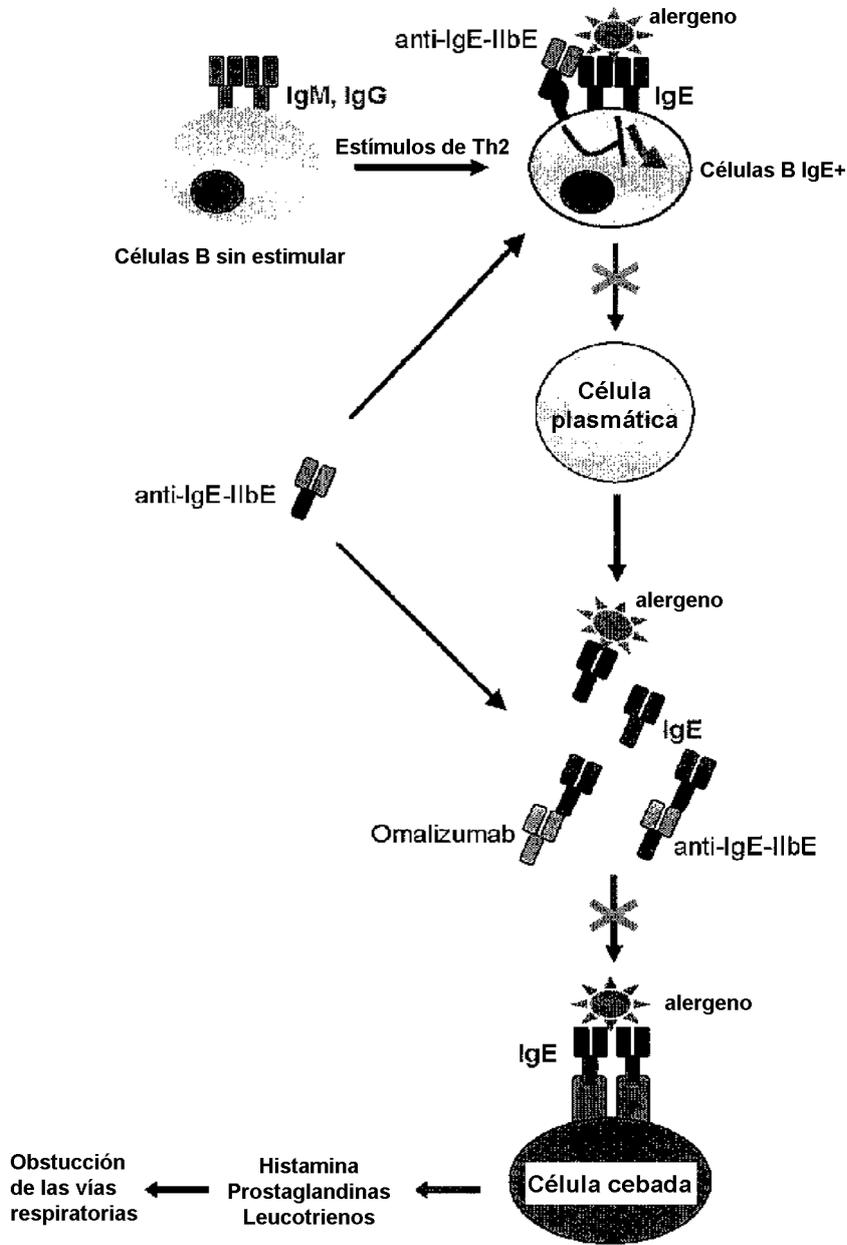


Figura 2

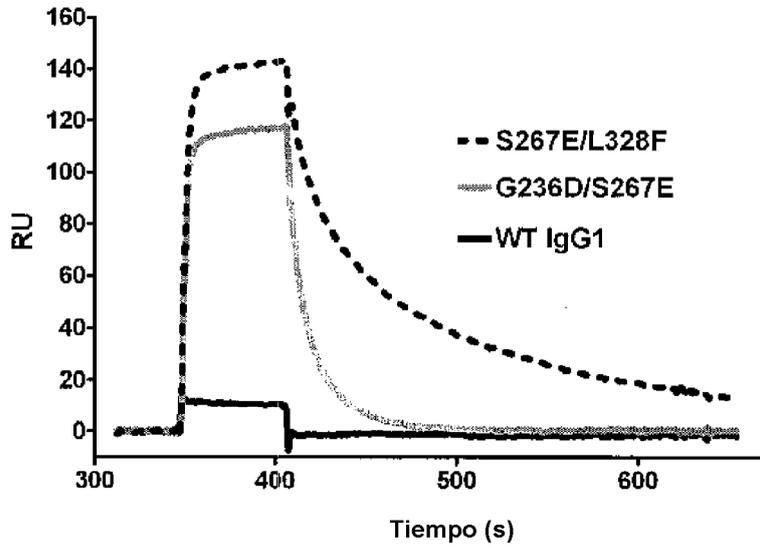


Figura 3

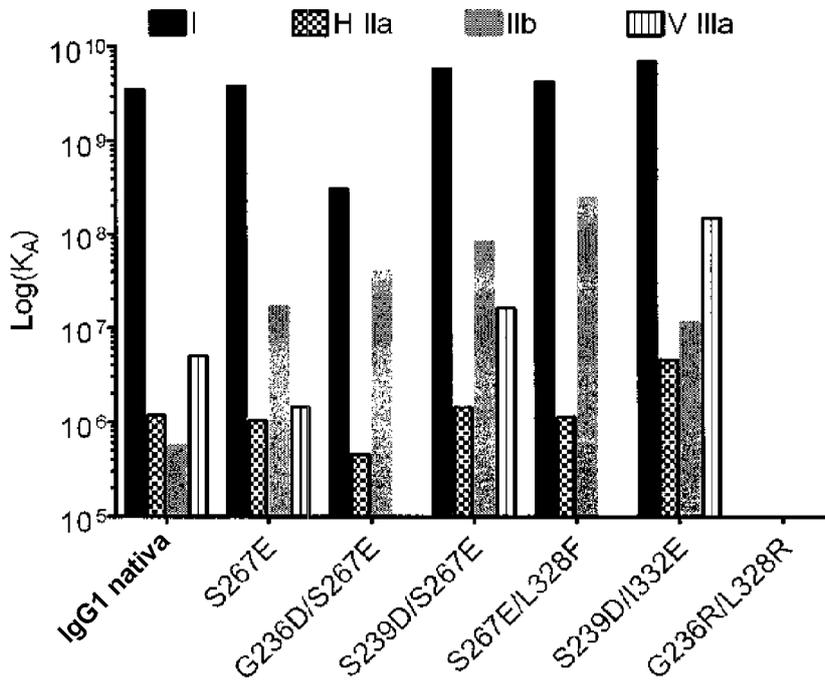


Figura 4

Anticuerpo	FcγRI		H131 FcγRIIa		FcγRIIb		V158 FcγRIIIa	
	KD (M)	n.º de veces	KD (M)	n.º de veces	KD (M)	n.º de veces	KD (M)	n.º de veces
IgG1 nativa	2,8E-10	1,0	8,5E-07	1,0	1,8E-06	1,0	2,0E-07	1,0
S267E	2,6E-10	1,1	9,6E-07	0,89	6,0E-08	30	6,9E-07	0,29
G236D/S267E	3,2E-09	0,088	2,2E-06	0,39	2,5E-08	72	n.d.	
S239D/S267E	1,7E-10	1,6	7,0E-07	1,2	1,2E-08	150	6,2E-08	3
S267E/L328F	2,3E-10	1,2	8,8E-07	0,97	4,2E-09	429	n.d.	
S239D/I332E	1,4E-10	2,0	2,2E-07	3,9	8,8E-08	20	6,8E-09	29
G236R/L328R	n.d.		n.d.		n.d.		n.d.	

**Figura 5**

Omalizumab VH (SEQ ID NO:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTS  
S

Omalizumab VH CDR1 (SEQ ID NO:2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEQ ID NO:3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEQ ID NO:4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEQ ID NO:5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES  
VPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEQ ID NO:6)

QSVDDYDGDSY

Omalizumab VL CDR2 (SEQ ID NO:7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEQ ID NO:8)

SHEDPYT

MaE11 VH (SEQ ID NO:9)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNY  
NPSLKNRISVTRDTSQNQFFLKLNSATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTS  
S

MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEQ ID NO:13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLGSEI  
PARFSGSGSGDFTLNHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:14)

QSVDDYDGDSY

MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:15)

AASYLGS

Figura 5 (continuación)

MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:16)

SHEDPYT

H1L1MaE11 VH (SEQ ID NO:17)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRVTIS  
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLTVSS

H1L1 MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:18)

YSITSGYSW

H1L1 MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:19)

TYDGS

H1L1 MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:20)

GSHYFGHWHFVAV

H1L1 MaE11 VL (SEQ ID NO:21)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE  
IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

H1L1 MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:22)

QSVDDYDGDSY

H1L1 MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:23)

AASYLGS

H1L1 MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:24)

SHEDPYT

TES-C21 VH (SEQ ID NO:25)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYTFSMYWLEWVKQRPGHGLEWVGEISPGTFTTN  
YNEKFKAKATFTADTSSNTAYLQLSGLTSEDSAVYFCARFSHFSGSNYDYFDYWGQGTSLT  
VSS

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

YTFSMYW

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

SPGTFT

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

FSHFSGSNYDYFDY

TES-C21 VL (SEQ ID NO:29)

DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTNIHWYQQRTDGSPrLLIKYASESISGIPSRFSG  
SGSGTEFTLNINSVESEDIADYYCQQSDSWPTTFGGGTKLEIK

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

QSIGTN

**Figura 5 (continuación)**

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

YASESIS

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

SDSWPTT

**Figura 6**

Cadena ligera Ckappa (SEQ ID NO:33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena constante de IgG1 nativa (SEQ ID NO:34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG  
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGGPS  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY  
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN  
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**Figura 7**

Cadena ligera de omalizumab (VH-C<sub>κ</sub>) (SEQ ID NO:37)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES  
G VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFP  
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL  
TLISKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGQGLTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY  
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGQGLTVTVS  
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK  
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLSPGK

Cadena ligera H1L1 MaE11 (VH-C<sub>κ</sub>) (SEQ ID NO:40)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE  
IPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP  
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT  
LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTIS  
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYT  
QKLSLSLSPGK

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

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTIS  
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS  
TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT  
PEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG  
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYT  
QKLSLSLSPGK

Figura 8

Anticuerpo	IgE KD (M)	FcγRIIb KD (M)	FcγRIIb n.º de veces
Omalizumab_IgG1_WT	2,2E-10	1,94E-06	1,0
Omalizumab_IgG1_S267E/L328F	2,0E-10	1,4E-08	135
MaE11_H1L1_IgG1_WT	6,1E-11	2,0E-06	1,0
MaE11_H1L1_IgG1_S267E/L328F	6,3E-11	5,6E-09	366
MaE11_H1L1_IgG1_G236R/L328R	6,4E-11	NB	

Figura 9

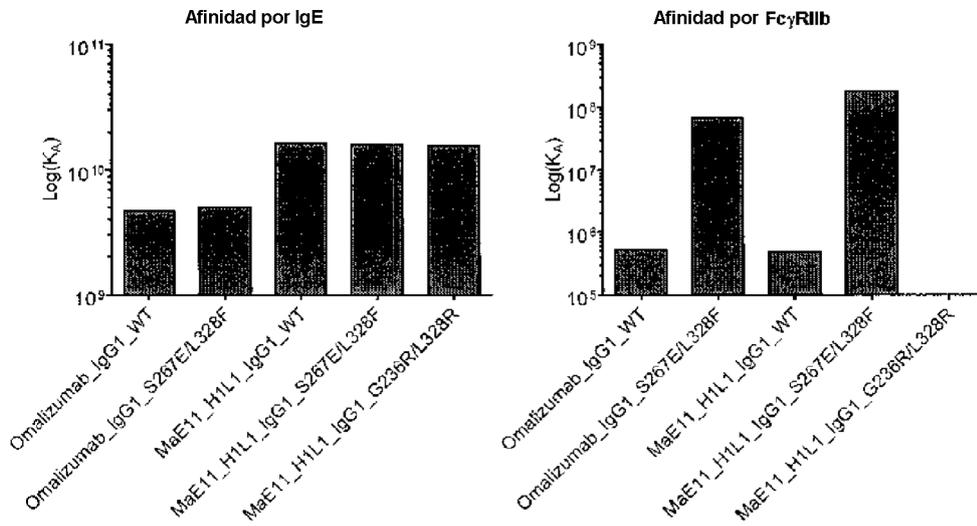


Figura 10

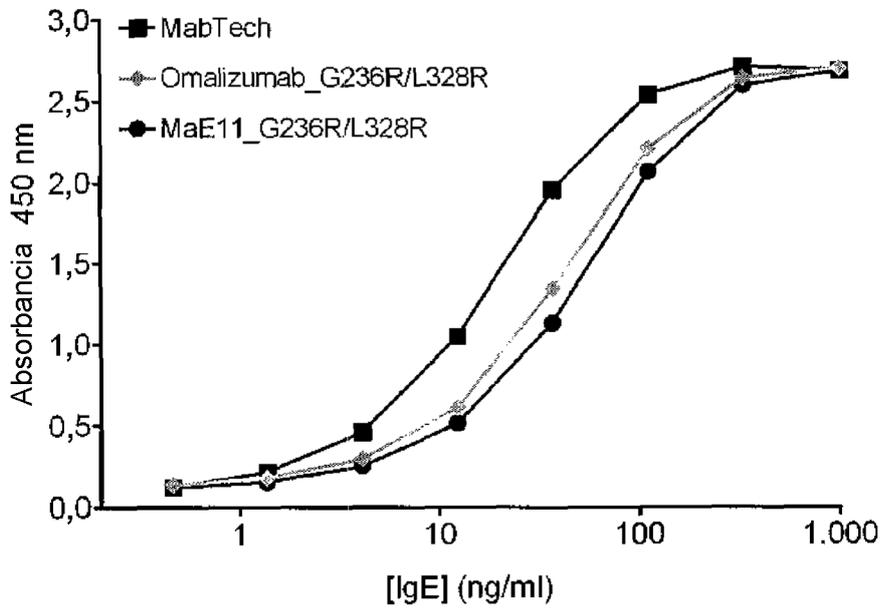


Figura 11

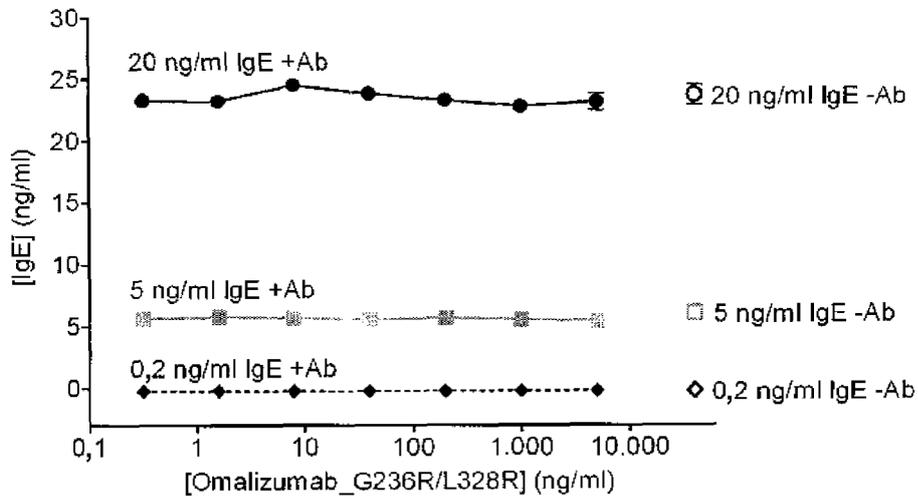


Figura 12

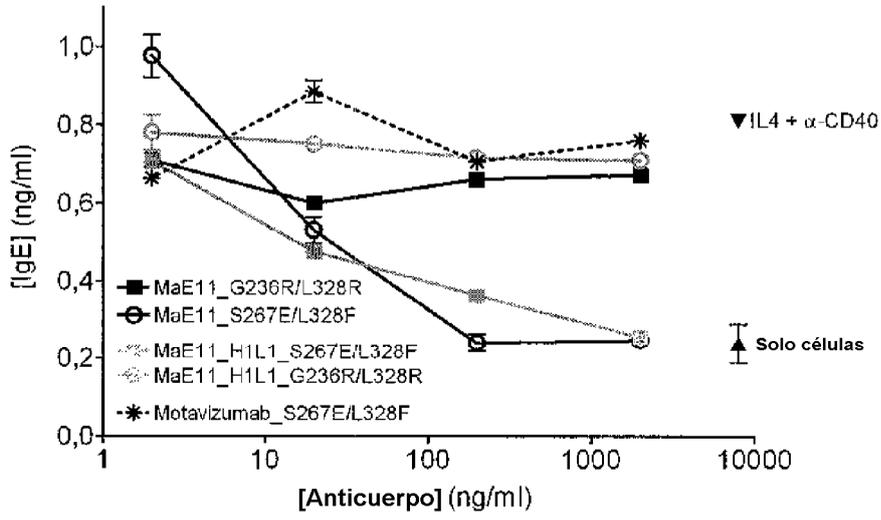


Figura 13

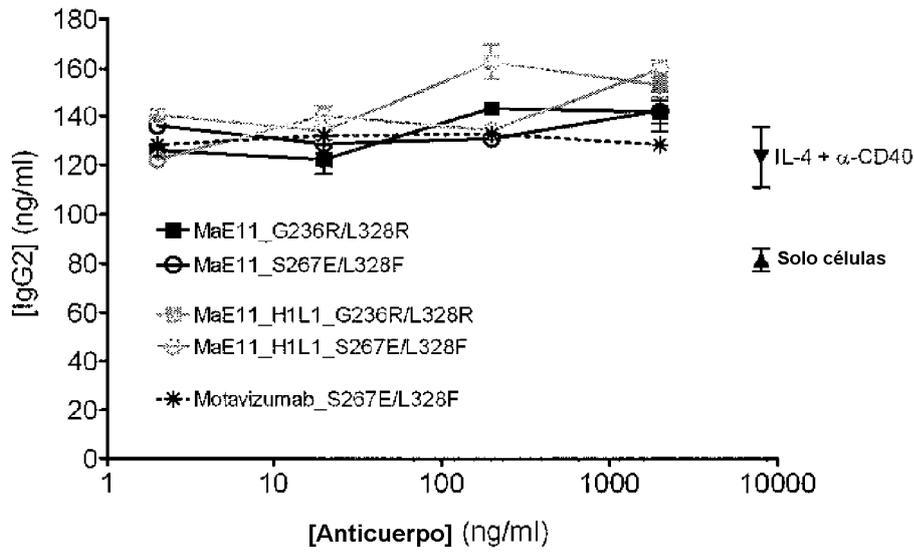


Figura 14

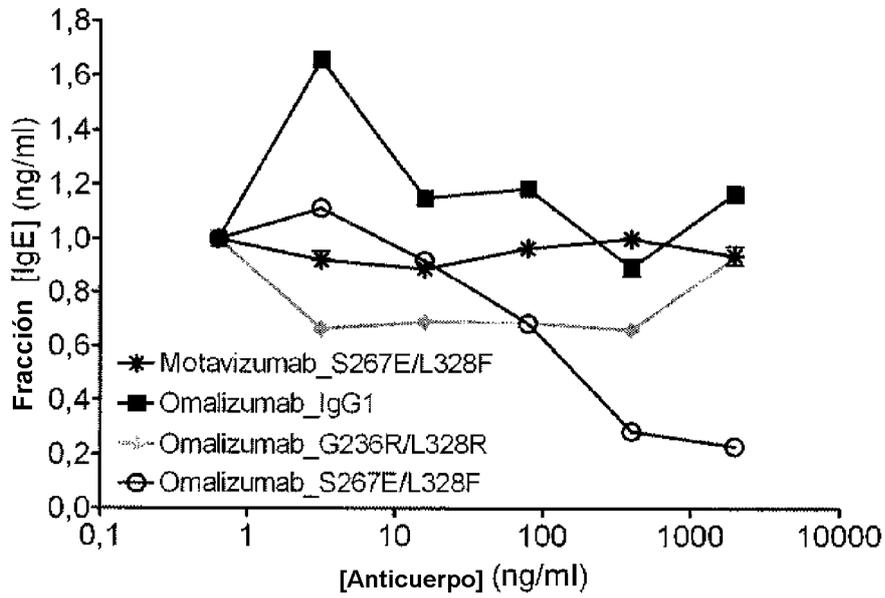


Figura 15

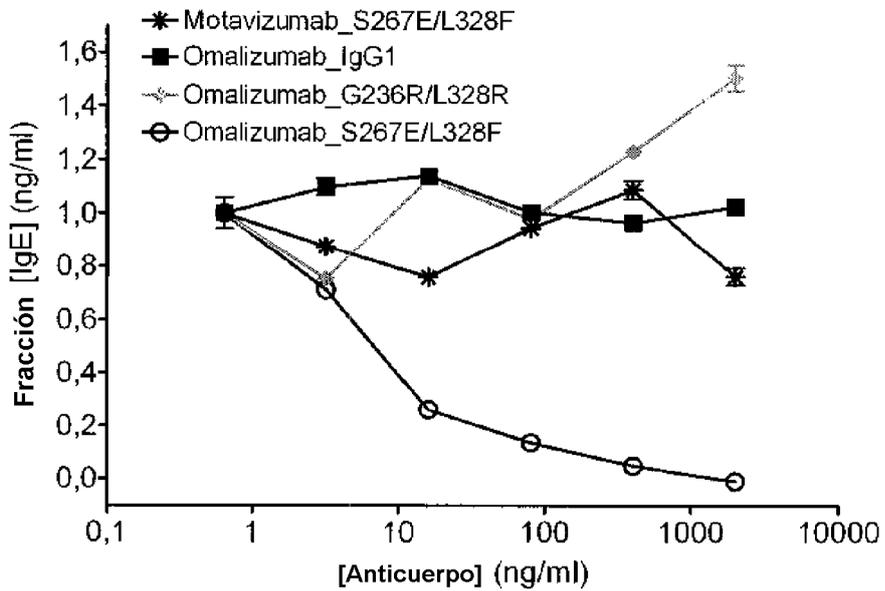


Figura 16

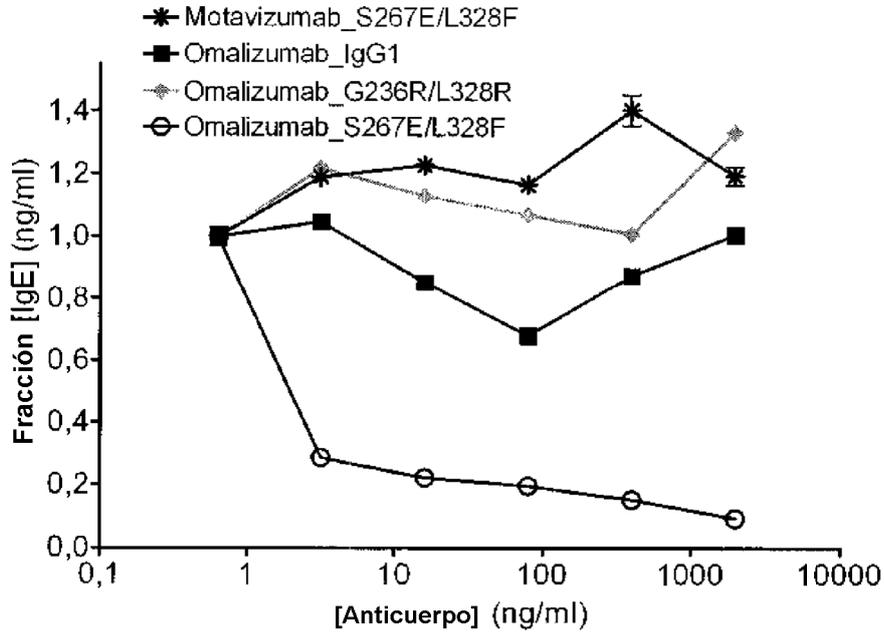


Figura 17

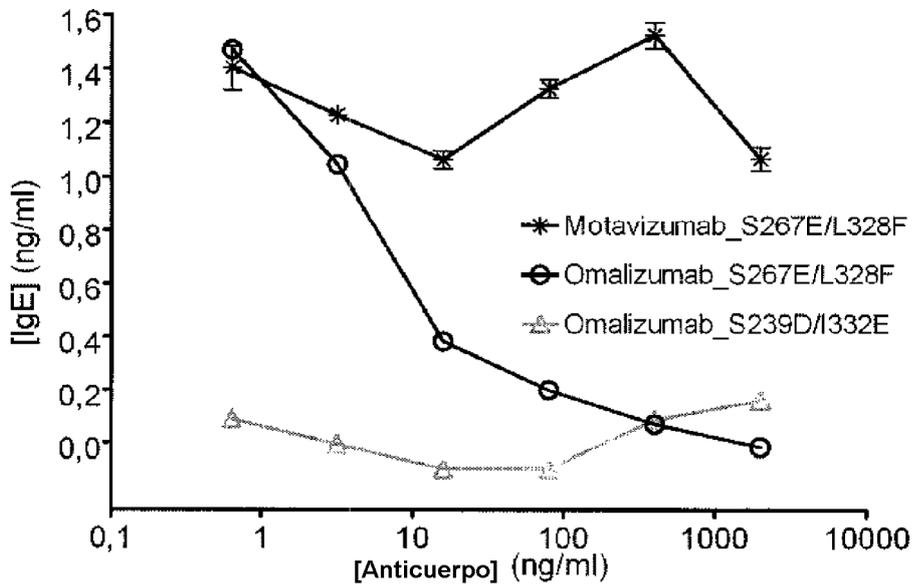


Figura 18

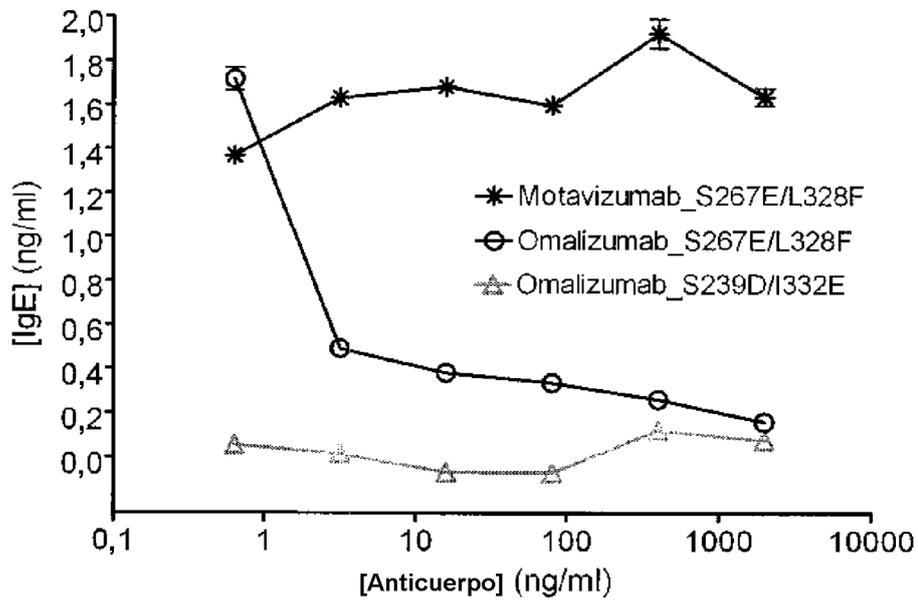


Figura 19

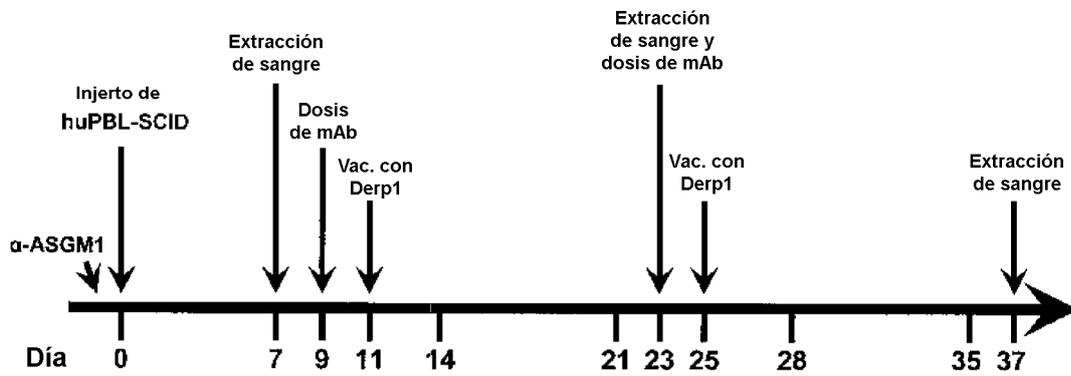


Figura 20

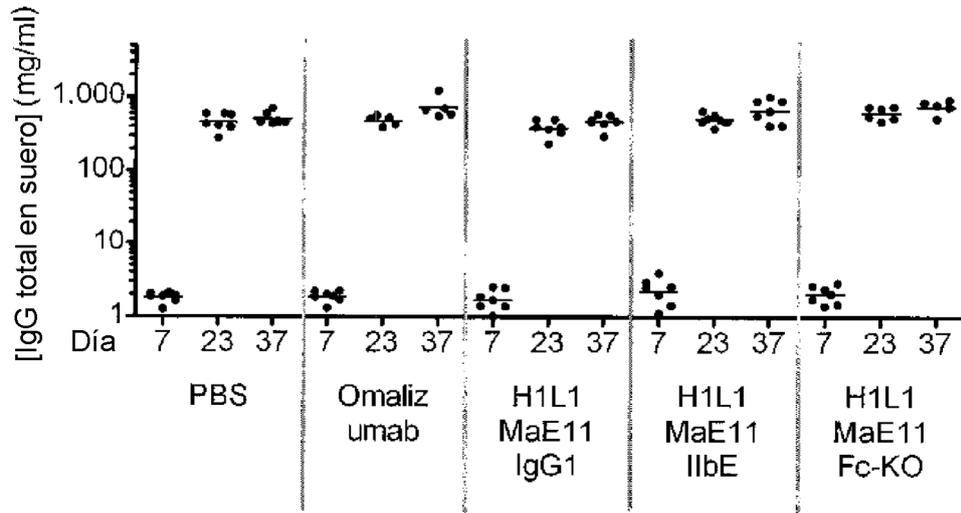


Figura 21

