

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 176**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2015 PCT/EP2015/068667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2016 WO16023985**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015 E 15757168 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3180358**

54 Título: **Nuevos anticuerpos dirigidos contra el receptor IIB de Fc gamma y el receptor de Fc epsilon**

30 Prioridad:

13.08.2014 EP 14002825

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

15.01.2021

73 Titular/es:

**SUPREMOL GMBH (100.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Martinsried/München, DE**

72 Inventor/es:

**CARLE, ANNA;
DIRENBERGER, CAROLIN;
SONDERMANN, PETER;
MUELLER, MARTINA;
RIETH, NICOLE y
POHL, THOMAS**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 802 176 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

Nuevos anticuerpos dirigidos contra el receptor IIB de Fc gamma y el receptor de Fc épsilon

5 Un anticuerpo se une a un antígeno y lo neutraliza evitando que se una a su diana endógena (por ejemplo, receptor o ligando) o induciendo respuestas efectoras que conducen a la eliminación del antígeno. Para eliminar y/o destruir de manera eficiente los antígenos foráneos al cuerpo, un anticuerpo debe presentar tanto una alta afinidad por su antígeno como funciones efectoras eficaces. Los anticuerpos que tienen multiespecificidades (tales como, por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) son útiles para mediar respuestas complementarias o sinérgicas de múltiples antígenos.

10 Las funciones efectoras del anticuerpo están mediadas por una región Fc de anticuerpo. Las funciones efectoras se dividen en dos categorías: (1) funciones efectoras que operan después de la unión del anticuerpo a un antígeno (estas funciones implican la participación de la cascada del complemento o células que portan el receptor de Fc (FcR)); y (2) funciones efectoras que operan independientemente de la unión al antígeno (estas funciones confieren persistencia de anticuerpo en la circulación y su capacidad de transferirse a través de barreras celulares por transcitos). Debido a que los receptores de Fc median la función efectora del anticuerpo al unirse a la región Fc del anticuerpo relacionado del receptor, los FcR se definen por su especificidad para los isotipos de inmunoglobulina: los receptores de Fc específicos para anticuerpos IgG se denominan Fc γ R; los receptores de Fc para anticuerpos IgE son Fc ϵ R; los receptores de Fc para anticuerpos IgA son Fc α R, y así sucesivamente.

20 Se han identificado tres subclases de Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Fc γ R IIB se caracteriza por la presencia de un motivo ITIM (secuencia de consenso: V/I-X-Y-X₂-V/L, Isakov (1997), Immunol Res. 16, 85-100) en el dominio citoplasmático, que se fosforila por la cinasa Lyn tras la unión de IC o agregados de Ig y el ligamiento conjunto con receptores de Fc γ activadores que portan ITAM. El ITIM fosforilado atrae el dominio SH2 de la inositol polifosfato 5'-fosfatasa (SHIP), que a su vez hidroliza los mensajeros de fosfoinositol liberados como consecuencia de la activación de la tirosina cinasa mediada por Fc γ R que contiene ITAM, evitando en consecuencia la entrada de Ca²⁺ intracelular. La reticulación de Fc γ R IIB inhibe la respuesta activadora al ligamiento de Fc γ R que a su vez inhibe la activación de células B, la proliferación y la secreción de anticuerpos.

30 Los receptores de Fc épsilon (Fc ϵ R) se encuentran en la superficie de los mastocitos y basófilos, así como en eosinófilos, monocitos, macrófagos y plaquetas en humanos. Hay dos tipos de receptores de Fc ϵ , Fc ϵ RI (receptor de Fc ϵ de tipo I), el receptor de IgE de alta afinidad, y Fc ϵ R II (receptor de Fc ϵ de tipo II), también conocido como CD23, el receptor de IgE de baja afinidad. La IgE puede regular por incremento la expresión de ambos tipos de receptores de Fc ϵ .

35 La inmunoglobulina E (IgE) es una clase de anticuerpo (o "isotipo" de inmunoglobulina (Ig)) que se ha encontrado sólo en mamíferos. La IgE existe como monómeros que consisten en dos cadenas pesadas (cadena ϵ) y dos cadenas ligeras, conteniendo la cadena ϵ 4 dominios constantes de tipo Ig (C ϵ 1-C ϵ 4). La IgE también desempeña un papel esencial en la hipersensibilidad tipo I (Gould H *et al.* (2003), Annu. Rev. Immunol. 21: 579-628), que manifiesta diversas enfermedades alérgicas, tales como asma alérgica, la mayoría de los tipos de sinusitis, rinitis alérgica, alergia alimentaria y algunos tipos de urticaria crónica y dermatitis atópica. La IgE también desempeña un papel fundamental en estados alérgicos, tales como reacciones anafilácticas a determinados fármacos, picaduras de abejas y preparaciones de antígenos usadas en inmunoterapia de desensibilización específica.

45 La IgE prepara la respuesta alérgica mediada por IgE uniéndose a los Fc ϵ R que se encuentran en la superficie de los mastocitos y basófilos. La unión de antígenos a IgE ya unida por el Fc ϵ RI en los mastocitos conduce a la reticulación de la IgE unida y a la agregación del Fc ϵ RI subyacente, lo que conduce a la desgranulación y a la liberación de mediadores de las células. Los basófilos, tras la reticulación de su IgE de superficie por antígenos, liberan citocinas tipo 2 similares a interleucina 4 (IL-4) e interleucina 13 (IL-13) y otros mediadores inflamatorios. El receptor de baja afinidad (Fc ϵ R II) siempre se expresa en las células B, pero puede inducirse su expresión en las superficies de macrófagos, eosinófilos, plaquetas y algunas células T por IL-4.

55 Los mastocitos y los basófilos son células reguladoras inmunitarias importantes y células efectoras centrales en las reacciones alérgicas dependientes de IgE y en muchos otros procesos inflamatorios agudos o crónicos. Estos tipos de células tienen ambos receptores para IgG e IgE. La activación del receptor de alta afinidad para IgE (RI de Fc épsilon) en células efectoras alérgicas, tales como los mastocitos y los basófilos, induce una multitud de señales positivas a través de motivos de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM), lo que conduce a la rápida manifestación de reacciones inflamatorias alérgicas. En contraposición, la agregación conjunta del receptor R IIB de Fc gamma de IgG media señales inhibitorias a través de motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM). La solicitud de patente europea n.º 13004094.2 se presentó el 16 de agosto de 2013 y se publicó como EP 2 837 637 A1 el 18 de febrero de 2015, y divulga un anticuerpo anti-Fc γ R IIB (art. 54 (3) EPC).

65 Los avances en la regulación positiva y negativa de la expresión y señalización del receptor de Fc han arrojado luz sobre el papel de los receptores de Fc en el sistema inmunitario, lo que indica que son estructuras bifuncionales, inhibitorias y activadoras. Basándose en estos hallazgos, se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas, tales

como el uso de proteínas de fusión quiméricas, que activan concomitantemente RI de Fc épsilon y RIIB de Fc gamma. Estos nuevos enfoques aprovechan el carácter bivalente de los receptores de Fc y allanan el camino para estrategias innovadoras para modular las reacciones inmunitarias alérgicas. Un ejemplo de una proteína de fusión quimérica de este tipo se divulga en el documento WO 2002/088317.

Sin embargo, a pesar del hecho de que en la técnica anterior se conocen aún más proteínas de fusión quiméricas, véase también el documento WO 2006/028956, no obstante, es altamente deseable proporcionar proteínas de fusión quiméricas mejoradas que ejerzan al menos dos funciones: una la unión al receptor de Fc épsilon y la segunda la unión al receptor IIB de Fc gamma, agregando conjuntamente de ese modo ambos receptores.

La presente divulgación satisface esta demanda al proporcionar las moléculas de reconocimiento descritas a continuación en el presente documento, caracterizadas en las reivindicaciones e ilustradas por los ejemplos y las figuras adjuntas. La presente invención se define por las reivindicaciones. La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.

Sabiendo que la agregación del receptor de IgE con el receptor de IgG (Fc γ RIIB) en basófilos o mastocitos inhibe la desgranulación celular inducida por alérgenos (Daeron (1997), *Int. Arch. Allergy Immunol.* 113, 138-141), los presentes inventores proporcionan moléculas de reconocimiento que, por así decirlo, no sólo reticulan o agregan conjuntamente estos dos receptores con el objetivo de inhibir la activación mediada por IgE de mastocitos y basófilos, sino que también potencian la función reguladora negativa de RIIB de Fc gamma con el objetivo de mejorar el tratamiento de enfermedades asociadas con basófilos y/o mastocitos, tales como enfermedades alérgicas. Tal como se describió anteriormente en el presente documento, la activación del receptor de alta afinidad para IgE (RI de Fc épsilon) en células efectoras alérgicas tales como mastocitos y basófilos conduce a la rápida manifestación de reacciones inflamatorias alérgicas. En contraposición, la agregación conjunta del receptor RIIB de Fc gamma de IgG media señales inhibitoras a través de motivos de inhibición de inmunorreceptor basados en tirosina (ITIM). Por tanto, los presentes inventores asumieron, sin estar limitados por la teoría, que potenciar/fortalecer la fosforilación conocida de ITIM de RIIB de Fc gamma efectuada por la agregación conjunta de RIIB de Fc gamma y receptor de Fc épsilon (véase Zhu *et al.* (2002), *Nat. Med.* 8 (5), 518-521) podría ser beneficioso para contrarrestar o incluso superar la función activadora del receptor de Fc épsilon tras la unión de IgE, lo que conduce a la liberación de mediadores preformados y a la síntesis de leucotrienos y quimiocinas de acción posterior, que contribuyen a, por ejemplo, la enfermedad alérgica

Teniendo este objetivo en mente, para su sorpresa, los presentes inventores observaron que las moléculas de reconocimiento, en particular los anticuerpos proporcionados por la presente divulgación, aumentan notablemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB y, por tanto, presuntamente potencian la señal inhibitora que ya se logra mediante la agregación conjunta de RIIB de Fc gamma y receptor de Fc épsilon de modo que idealmente supere la señal activadora impulsada por la activación del receptor de Fc épsilon tras la unión de IgE. Por tanto, las moléculas de reconocimiento, en particular los anticuerpos divulgados en el presente documento, proporcionan dos funciones ventajosas: reticulan RIIB de Fc gamma y R de Fc épsilon, lo que conduce a la fosforilación de ITIM y, por tanto, a la inhibición de la señalización de R de Fc épsilon, y potencian como tal la fosforilación de ITIM de RIIB de Fc gamma a través de su unión a dicho receptor que una vez más inhibe la señalización del receptor de Fc épsilon en basófilos y mastocitos. Por tanto, las moléculas de reconocimiento ejercen un doble efecto, en particular los anticuerpos de la presente divulgación, sobre el papel inhibitor de la señalización mediada por RIIB de Fc gamma en células que contribuyen masivamente a la enfermedad asociada con mastocitos y/o basófilos. Para aprovechar esta señalización inhibitora mediada por RIIB de Fc gamma en basófilos y mastocitos, los presentes inventores proporcionan las moléculas de reconocimiento, en particular anticuerpos de la presente divulgación que, en comparación con, por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra RIIB de Fc gamma conocidos en la técnica anterior, muestran sorprendentemente un efecto mucho más fuerte sobre la fosforilación de ITIM que no podría haberse esperado. Tal efecto más fuerte es ventajoso, ya que ayuda en la señalización inhibitora en mastocitos y/o basófilos para inhibir la activación mediada por IgE de mastocitos y basófilos que desempeñan ambos un papel importante en la aparición y manifestación de, por ejemplo, enfermedades alérgicas

Tal como puede observarse en la figura 30, un anticuerpo IgE anti-receptor IIB de Fc gamma divulgado en el presente documento es capaz, de hecho, de reducir el número de eosinófilos activados después de su activación mediante polen (el 55,1%) hasta un nivel que corresponde a los eosinófilos sin tratar (el 10,6% frente al 9,5% de eosinófilos sin tratar). Esto muestra la potencia de un anticuerpo de este tipo en la regulación negativa de las células implicadas en, por ejemplo, enfermedades alérgicas, una vez que estas células se han activado por un alérgeno a través de la unión de IgE al alérgeno y con su dominio Fc al receptor de Fc épsilon. Los eosinófilos junto con los mastocitos y/o basófilos están implicados en enfermedades alérgicas. Por consiguiente, la suposición de los inventores de que potenciar/fortalecer la fosforilación conocida de ITIM de RIIB de Fc gamma efectuada por la agregación conjunta de RIIB de Fc gamma y receptor de Fc épsilon (véase Zhu *et al.* (2002), *Nat. Med.* 8 (5), 518-521) podría ser beneficioso para contrarrestar o incluso superar la función activadora del receptor de Fc épsilon tras la unión de IgE, parece ser prometedor en la lucha contra, por ejemplo, enfermedades alérgicas.

A partir de las moléculas de reconocimiento de la técnica anterior que se unen a RIIB de Fc gamma, en particular moléculas de reconocimiento tales como los anticuerpos divulgados en el presente documento, las propiedades ventajosas de los polipéptidos no podían ni haberse esperado ni previsto, y mucho menos habría habido una

expectativa razonable de éxito para proporcionarlos, en particular las CDR o la cadena variable pesada y/o ligera de anticuerpos tal como se caracterizan en el presente documento. Además de esta propiedad mejorada, las moléculas de reconocimiento descritas en el presente documento también tienen ventajosamente una alta especificidad para Fc γ R1IB humano y/o no son bloqueantes, es decir, que su unión al receptor de Fc a través de su(s) región/región variable(s) no interfiere con la unión de complejos inmunitarios (IC) o IgG agregada a las células.

Ventajosamente, una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo divulgado en el presente documento, se une en "cis" a una célula que expresa un receptor de Fc epsilon (Fc ϵ R) y un receptor IIB de Fc gamma (Fc γ R1IB), es decir, dicha molécula de reconocimiento se une a Fc ϵ R y Fc γ R1IB en la misma célula, en la que tal célula expresa Fc ϵ R y Fc γ R1IB. Esta propiedad de una molécula de reconocimiento puede someterse a prueba fácilmente según la prueba de activación de basófilos descrita en el ejemplo 5, con la excepción de que no se añade antígeno a sangre completa heparinizada. Brevemente, se pone en contacto sangre completa heparinizada con una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento. Posteriormente, se incubaba la sangre completa con un anticuerpo de detección que une la molécula CD63 en basófilos en la sangre completa, en la que el anticuerpo de detección se caracteriza por un marcador detectable, por ejemplo, un marcador de fluorescencia, y se mide el número de células que expresan CD63 por encima de un nivel umbral por medio de, por ejemplo, la técnica de FACS (clasificación celular activada por fluorescencia). Puede determinarse un nivel umbral basándose en la sangre completa heparinizada que no se puso en contacto con dicha molécula de reconocimiento (que corresponde a un control). Si las células no expresan CD63 por encima del nivel umbral, la molécula de reconocimiento se une preferentemente en cis, mientras que la expresión de CD63 por encima del nivel umbral es indicativa de que una molécula de reconocimiento se une a las células en trans, es decir, una molécula de reconocimiento se une a Fc ϵ R en una primera célula y a Fc γ R1IB en una segunda célula, o a Fc γ R1IB en una primera célula y a Fc ϵ R en una segunda célula. Sin embargo, tal como se expuso, en el contexto de la presente divulgación, se prefieren las moléculas de reconocimiento de unión en cis.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona moléculas de reconocimiento que se unen con un primer dominio de unión al receptor de Fc epsilon (Fc ϵ R) y con un segundo dominio de unión al receptor IIB de Fc gamma (Fc γ R1IB).

Se considera que las moléculas de reconocimiento de la presente divulgación compiten con los propios anticuerpos IgE patógenos del cuerpo para unirse al receptor RI de Fc epsilon (Fc ϵ RI) a través de su parte Fc y simultáneamente reticular conjuntamente Fc ϵ RI con Fc γ R1IB. Se considera que este modo de acción evita la liberación de mediadores de mastocitos y/o basófilos independientemente de la especificidad de alérgenos de la IgE unida. Este mecanismo se ha caracterizado por los presentes inventores, por ejemplo, mediante el uso de basófilos que expresan Fc ϵ RI de donantes atópicos (es decir, donantes que tienen una predisposición hacia el desarrollo de reacciones inmunitarias de hipersensibilidad en respuesta a alérgenos). Los basófilos expuestos a alérgenos de los donantes atópicos mencionados anteriormente tratados con una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento mostraron una activación significativamente reducida en comparación con el control tal como se demuestra en los ejemplos adjuntos.

Una "molécula de reconocimiento" cuando se usa en el presente documento es un polipéptido que comprende uno o más dominios de unión con un primer dominio de unión que se une al receptor de Fc epsilon (Fc ϵ R) y con un segundo dominio de unión que se une al receptor IIB de Fc gamma (Fc γ R1IB). Una molécula de reconocimiento proporciona el armazón para dicho uno o más dominios de unión de modo que dichos dominios de unión pueden unirse/interaccionar con una estructura/antígeno/epitopo diana dada. Por ejemplo, un armazón de este tipo podría proporcionarlo la proteína A, en particular el dominio Z de la misma (affibodies), ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios de Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, Min-23 (*knottins*), lipocalinas (anticalinas), neocarzinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición consenso de anquirina o tiorredoxina (Skerra, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 295-304 (2005); Hosse *et al.*, *Protein Sci.* 15, 14-27 (2006); Nicaise *et al.*, *Protein Sci.* 13, 1882-1891 (2004); Nygren y Uhlen, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 7, 463-469 (1997)). La molécula de reconocimiento de la invención es un anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1.

Los dominios de unión de la molécula de reconocimiento de la presente invención pueden ligarse mediante un ligador. El ligador puede ser un ligador peptídico. El ligador puede comprender (o consistir en) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más aminoácidos. Los ejemplos preferidos de ligadores peptídicos son (G₄S)_n, estando n en un intervalo de 1 a 5; (AP)₂; (AP)₄; (AP)₅₋₇. El término "dominio de unión" caracteriza en relación con la presente divulgación un dominio que es capaz de unirse específicamente a/interaccionar con un epitopo diana dado o un sitio diana dado en sus moléculas diana Fc ϵ R y Fc γ R1IB, respectivamente. Los dominios de unión pueden derivarse de un donante de dominio de unión tal como, por ejemplo, de un anticuerpo o de cualquiera de los armazones mencionados anteriormente. El término "dominio de unión" cuando se usa en el presente documento abarca que un dominio de unión puede unirse activamente a una diana o puede unirse pasivamente, por ejemplo, por un receptor. Por consiguiente, un dominio de unión en el sentido de las presentes moléculas divulgadas puede ser un ligando de un receptor, tal como un receptor de Fc.

Un dominio de unión preferido de una molécula de reconocimiento es al menos una porción de un dominio Fab. Un "dominio Fab" cuando se usa en el presente documento abarca (a) región/región variable(s) de cadena pesada y/o ligera o CDR y/o (a) región/región de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera. Por tanto, se

5 prefiere que (a) la(s) región/regiones variable(s) tal(es) como una región variable de cadena pesada y/o ligera, o CDR y/o (a) la(s) región/regiones de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera estén comprendidas por un dominio de unión tal como se describe en el presente documento. Por tanto, una molécula de reconocimiento comprende preferiblemente como primer y segundo dominio de unión un dominio Fab, preferiblemente (a) región/regiones variable(s) tal(es) como una región variable de cadena pesada y/o ligera, o CDR y/o (a) región/regiones de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera.

10 Otro dominio de unión referido de una molécula de reconocimiento es la región (o dominio) constante (dominio Fc) de un anticuerpo IgG o IgE o una porción del mismo. Una "porción" de un dominio Fc cuando se usa en el presente documento es preferiblemente de una longitud tal que está unida por su receptor de Fc relacionado tal como el receptor de Fc épsilon o el receptor IIB de Fc gamma.

15 Por tanto, una molécula de reconocimiento divulgada comprende como primer y segundo dominio de unión el dominio Fc de un anticuerpo IgG o IgE o una porción del mismo, cuya porción está unida por el receptor IIB de Fc gamma o el receptor de Fc épsilon, respectivamente.

20 También se divulga que una molécula de reconocimiento de la presente divulgación comprende, como primer dominio de unión, un dominio Fab, preferiblemente una región variable tal como una región variable de cadena pesada y/o ligera, o CDR y/o regiones de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera que se une al receptor de Fc épsilon y, como segundo dominio de unión, un dominio Fc de IgG o una porción del mismo que está unido por el receptor IIB de Fc gamma.

25 Se prefiere que una molécula de reconocimiento de la presente divulgación comprenda, como primer dominio de unión, un dominio Fc de IgE o una porción del mismo que está unido por el receptor de Fc épsilon y, como segundo dominio de unión, un dominio Fab, preferiblemente una región variable tal como una región variable de cadena pesada y/o ligera, o CDR y/o regiones de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera que se une al receptor IIB de Fc gamma. La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.

30 El término "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un dominio de unión. Un "epítipo" es antigénico y, por tanto, el término epítipo a veces también se denomina en el presente documento "estructura antigénica" o "determinante antigénico". Por tanto, el dominio de unión es un "sitio de interacción de antígeno". Dicha unión/interacción también se entiende que define un "reconocimiento específico". Un epítipo preferido en el sentido de la presente divulgación se ubica dentro del receptor de Fc épsilon y el receptor IIB de Fc gamma, respectivamente. Preferiblemente, un epítipo de este tipo está ubicado en la porción extracelular de cualquiera de estos dos receptores de Fc. Los "epítipos" pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Un "epítipo lineal" es un epítipo en el que una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítipo reconocido. Un epítipo lineal normalmente incluye al menos 3, o al menos 4, y más habitualmente, al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos en una secuencia única. Un "epítipo conformacional", a diferencia de un epítipo lineal, es un epítipo en el que la secuencia primaria de los aminoácidos que comprenden el epítipo no es el único componente definitorio del epítipo reconocido (por ejemplo, un epítipo en el que la secuencia primaria de aminoácidos no se reconoce necesariamente por el dominio de unión). Normalmente, un epítipo conformacional comprende un mayor número de aminoácidos en relación con un epítipo lineal. Con respecto al reconocimiento de epítipos conformacionales, el dominio de unión reconoce una estructura tridimensional del antígeno, preferiblemente un péptido o una proteína, o un fragmento de los mismos. Por ejemplo, cuando una molécula de proteína se pliega para formar una estructura tridimensional, determinados aminoácidos y/o el esqueleto del polipéptido que forma el epítipo conformacional se yuxtaponen permitiendo que el anticuerpo reconozca un epítipo tridimensional presente solamente en la estructura tridimensional. Los métodos para determinar la conformación de los epítipos incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN en 2D) y marcaje de espín dirigido al sitio y espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR).

55 Un dominio de unión de una molécula de reconocimiento, en particular un anticuerpo de la presente invención, se une ventajosamente de manera específica a Fc ϵ R y Fc γ R IIB, respectivamente. Los términos "(capaz de) unirse a", "que reconoce específicamente", "dirigido contra" y "que reacciona con" significan según esta invención que un dominio de unión es capaz de interactuar específicamente con uno o más, tal como al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro aminoácidos de un epítipo.

60 El término "receptor IIB de Fc gamma" se usa en el presente documento de manera intercambiable con "Fc γ R IIB" o "receptor IIB de Fc gamma" o "receptor IIB de Fc γ " o "Fc γ R IIB" y comprende tanto Fc γ R IIB membranosos como Fc γ R IIB solubles (es decir, la parte extracelular de un receptor IIB de Fc γ). Dicho término también incluye variantes de Fc γ R IIB tales como Fc γ R IIB1 y Fc γ R IIB2 que difieren entre sí en una inserción de secuencia de 19 aminoácidos en el dominio citoplasmático de Fc γ R IIB1. Otra variante abarcada por dicho término es Fc γ R IIB3, que es idéntica a Fc γ R IIB2, pero carece de información para el supuesto sitio de escisión de peptidasa señal. A veces, Fc γ R IIB también se denomina en el presente documento "CD32B". Por tanto, este término, así como los otros términos usados para designar el

receptor IIB de Fc gamma tal como se describió anteriormente, pueden usarse de manera intercambiable con el término "CD32B". El receptor IIB de Fc gamma pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas de proteínas y se encuentra en muchos linajes hematopoyéticos. Como su nombre indica, el receptor IIB de Fc reconoce y se une a la parte Fc (fragmento, cristalizable) de los anticuerpos, es decir, el fragmento que corresponde a los dos dominios C-terminales de ambas cadenas pesadas del anticuerpo y normalmente interacciona con las moléculas y células efectoras. Un Fc γ R IIB preferido se muestra en SEQ ID NO. 5. Un Fc γ R IIB soluble preferido se muestra en SEQ ID NO. 12.

"Fc γ R IIB soluble" también se conoce como "sFc γ R IIB". Tal como se usa en el presente documento, el término "receptor IIB de Fc γ soluble" y términos análogos se refieren a la parte extracelular del receptor IIB de Fc γ . Tal parte puede disolverse en un líquido. En general, las formas solubles de cualquier clase, isoforma o alelo de Fc γ R pueden identificarse mediante una "s" precedente, por ejemplo, sCD32 o sFc γ R IIB se refiere al receptor IIB de Fc gamma soluble. Normalmente, a diferencia del Fc γ R membranoso (es decir, unido a la membrana), el Fc γ R soluble no comprende una región transmembrana o una cola intracitoplasmática.

Preferiblemente, un Fc γ R IIB divulgado es de origen humano o un Fc γ R IIB humano. El término "de origen humano" debe interpretarse en su sentido más amplio. En general, significa que un Fc γ R (o una región o un fragmento del mismo) se asemeja o es similar a un Fc γ R humano (es decir, la proteína que se encuentra en el cuerpo humano) en cuanto a secuencia de aminoácidos y/o estructura.

Alternativamente, el Fc γ R IIB "de origen humano" puede ser un Fc γ R IIB recombinante que se obtiene mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula huésped, por ejemplo, tal como se describe por Sondermann y Jacob (1999), *Biol. Chem* 380 (6), 717-721. Brevemente, se obtiene un gen de interés de un organismo y se introduce en un vector, por ejemplo, un plásmido o un virus, que luego se usa para transferir el gen a una célula huésped que expresa el gen recombinante y produce un producto de proteína recombinante. El experto en la técnica sabrá fácilmente qué célula huésped seleccionar para obtener un Fc γ R IIB que sea, por ejemplo, adecuado para la preparación de una composición farmacéutica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, puede desearse un Fc γ R IIB no glicosilado. El experto en la técnica puede seleccionar entonces una célula huésped procarionta para la expresión de Fc γ R IIB que carece de la maquinaria enzimática necesaria para la glicosilación de proteínas. En una realización, el Fc γ R IIB puede expresarse en procariontas y posteriormente purificarse y replegarse según la descripción del documento WO 00/32767.

En otra realización, Fc γ R IIB también puede producirse en sistemas de expresión eucariotas. Los sistemas adecuados incluyen eucariotas con un aparato especializado para la producción de proteínas extracelulares, por ejemplo, células B. Otros posibles sistemas de expresión eucariotas incluyen, pero no se limitan a, células CHO o HEK. Dicho Fc γ R IIB soluble es, por tanto, Fc γ R IIB recombinante, soluble y glicosilado.

Fc γ R IIB tal como se hace referencia en el presente documento abarca además Fc γ R IIB que, en comparación con Fc γ R de tipo natural, se ha modificado o alterado con respecto a la secuencia de aminoácidos, e incluye, por ejemplo, sitios de glicosilación adicionales o similares. Sin embargo, también se prevén formas no glicosiladas de Fc γ R IIB y son una realización útil de Fc γ R IIB.

Para los propósitos de la presente divulgación, Fc ϵ R incluye tanto Fc ϵ R I como Fc ϵ R II. También se usan en el presente documento términos tales como "R de Fc epsilon" o "receptor de Fc epsilon" que designan todos un receptor que se une a una región constante o una porción de la misma de IgE. Todos estos términos pueden usarse de manera intercambiable.

Un primer y segundo dominio de unión preferido de la molécula de reconocimiento de la presente divulgación se deriva de un anticuerpo, preferiblemente dicho primer y/o segundo dominio de unión es una porción de un anticuerpo, tal como dominio(s) Fab, región/regiones variable(s) de cadena pesada y/o ligera, o CDR y/o regiones de entramado de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo.

Alternativamente, se prefiere que un dominio de unión en el sentido de las moléculas de reconocimiento divulgadas actualmente pueda ser una región constante (dominio constante) o al menos una porción de la misma que esté unida por un receptor de Fc, tal como el receptor de Fc epsilon o el receptor IIB de Fc gamma. Por tanto, se divulga que tanto el primer como el segundo dominio de unión pueden ser una región constante o al menos una porción de la misma de un anticuerpo, tal como la región Fc de una IgG o la región Fc de IgE que está unida por un receptor de Fc, tal como el receptor de Fc epsilon o el receptor de Fc gamma. Por consiguiente, el primer dominio de unión puede ser preferiblemente la región Fc de IgE o una porción de la misma que está unida por el receptor de Fc epsilon. El segundo dominio de unión puede ser la región Fc de IgG o una porción de la misma que está unida por el receptor IIB de Fc gamma.

Alternativamente, el primer dominio de unión puede ser al menos una porción de un anticuerpo que se une al receptor de Fc epsilon y el segundo dominio de unión puede ser al menos una porción de una región constante de IgG o una

porción de la misma que está unida por el receptor IIB de Fc gamma. Una molécula de este tipo es una molécula de reconocimiento útil y debe considerarse como un anticuerpo divulgado en el presente documento, es decir, tiene dominios variables y una región constante, tal como una región Fc de IgG.

5 El primer dominio puede ser preferiblemente al menos una porción de una región constante de IgE o una porción de la misma que está unida por el receptor de Fc épsilon y el segundo dominio puede ser al menos una porción de un anticuerpo que se une al receptor IIB de Fc gamma. Una molécula de este tipo es una molécula de reconocimiento útil y es, en una realización, un anticuerpo divulgado en el presente documento, es decir, tiene dominios variables y una
10 región constante, tal como una región Fc de IgE. La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.

En caso de que el segundo dominio de unión (que se une al receptor IIB de Fc gamma) de una molécula de reconocimiento tal como se describe en el presente documento sea una porción de un dominio Fab, se prefiere que comprenda en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestran en SEQ ID NO. 29, 30 y 31 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 32, 33 y 34, en el que una molécula de reconocimiento, preferiblemente un anticuerpo que tiene un segundo dominio de unión tal como se definió anteriormente, aumenta la fosforilación de ITIM de FcγRIIB de las células Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento.

20 Resulta evidente a partir de la figura 7 que los anticuerpos GB3 de la técnica anterior (véase el documento WO 2005/051999) y 2B6 (véase el documento WO 2004/016750 o el documento US 2009/074771 A1) no son capaces de aumentar la fosforilación de ITIM de FcγRIIB tal como puede aumentarse por una molécula de reconocimiento, preferiblemente un anticuerpo divulgado en el presente documento, tal como 8A6, como anticuerpo 8A6 o bien
25 quimérico o bien humanizado. Por tanto, la capacidad o incapacidad, respectivamente, de aumentar la fosforilación de ITIM de FcγRIIB parece depender de las CDR, particularmente de algunos residuos de aminoácidos clave que están presentes en 8A6, pero no en GB3 y/o 2B6, respectivamente. Por tanto, los aminoácidos que sólo están presentes en las CDR de 8A6 en las posiciones que corresponden a las posiciones respectivas dentro de una CDR de 2B6 o GB3 pueden considerarse "residuos clave".

30 La comparación visual de las CDR de 2B6, GB3 y 8A6 para los residuos clave revela que en H-CDR1, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29, en H-CDR2, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 30, en H-CDR3, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 31, en L-CDR1, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 32, en L-CDR2, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 33, y en L-CDR3, la
35 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 34, está beneficiosamente presente.

Las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las CDR de 8A6, GB3 y 2B6 también pueden expresarse como grado de identidad (en % de identidad) que se permite en las CDR de un anticuerpo divulgado en el presente documento cuando se usan las CDR de 8A6 como secuencias de referencia. Por consiguiente, una H-CDR1 de un
40 segundo dominio de unión de la presente divulgación se caracteriza preferiblemente por ser un 60% o más, tal como un 70%, un 80% o un 90% idéntica a la H-CDR1 tal como se muestra en SEQ ID NO. 20. En determinados aspectos divulgados, una H-CDR2 de un segundo dominio de unión divulgado en el presente documento se caracteriza por ser un 36% o más, tal como un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80% o un 90% idéntica a la H-CDR2 tal como se muestra en SEQ ID NO. 21. En determinados aspectos divulgados, una H-CDR3 de un segundo dominio de unión
45 divulgado en el presente documento se caracteriza por ser un 50% o más, tal como un 60%, un 70%, un 80% o un 90% idéntica a la H-CDR3 tal como se muestra en SEQ ID NO. 22. En determinados aspectos divulgados, una L-CDR1 de un segundo dominio de unión divulgado en el presente documento se caracteriza por ser un 64% o más, tal como un 70%, un 80% o un 90% idéntica a la L-CDR1 tal como se muestra en SEQ ID NO. 23. En determinados aspectos divulgados, una L-CDR2 de un segundo dominio de unión divulgado en el presente documento se caracteriza por ser un 29% o más, tal como un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80% o un 90% idéntica a la L-CDR2 tal como se muestra en SEQ ID NO. 24. En determinados aspectos divulgados, una L-CDR3 de un segundo dominio de unión divulgado en el presente documento se caracteriza por ser un 78% o más, tal como un 80% o un 90% idéntica a la L-CDR3 tal como se muestra en SEQ ID NO. 25.

55 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona en determinados aspectos divulgados una molécula de reconocimiento que tiene un segundo dominio de unión (que se une al receptor IIB de Fc gamma) que comprende en su región variable de cadena pesada una secuencia de H-CDR1 que es un 60% o más idéntica a la secuencia de H-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 20, una secuencia de H-CDR2 que es un 36% o más idéntica a la secuencia de H-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 21, una secuencia de H-CDR3 que es un 50% o más idéntica a la secuencia de H-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 22, una secuencia de L-CDR1 que es un 64% o más idéntica a la secuencia de L-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 23, una secuencia de L-CDR2 que es un 29% o más idéntica a la secuencia de L-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 24 y una secuencia de L-CDR3 que es un 78% o más idéntica a la secuencia de L-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 25. En realizaciones, una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, todavía comprende en las CDR de la región variable de cadena pesada y ligera de su segundo dominio de unión los "residuos clave" tal como se definen en SEQ ID NO. 29, 30, 31 (H-CDR) y tal como se definen en SEQ ID NO. 32, 33 y 34 (L-CDR). Una molécula de reconocimiento con un segundo dominio de unión de este tipo aumenta la fosforilación de
65

ITIM de Fc γ RIIB de células Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “% de identidad” se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos en la posición correspondiente dentro de la secuencia cuando se comparan dos secuencias de aminoácidos con una alineación de secuencia óptima tal como se ejemplifica mediante las técnicas ClustalW o X disponibles en www.clustal.org, o técnicas equivalentes. Por ejemplo, en el caso de las alineaciones de CDR, cada una de las CDR (de la región variable de cadena pesada y ligera, respectivamente) mostradas en SEQ ID NO. 20-25 sirve como secuencia de referencia para una secuencia de CDR de interés de una región variable de cadena pesada o ligera, respectivamente, por ejemplo, H-CDR1 de SEQ ID NO. 20 está alineada con una H-CDR1 de interés. Por consiguiente, se alinean ambas secuencias (secuencia de referencia y secuencia de interés), se identifican los residuos de aminoácidos idénticos entre ambas secuencias y se divide el número total de aminoácidos idénticos entre el número total de aminoácidos (longitud de aminoácidos) de SEQ ID NO. 20, 21, 22, 23, 24 ó 25, respectivamente, dependiendo de si se alinean H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, L-CDR1, L-CDR2 o L-CDR3. El resultado de esta división es un valor porcentual, es decir, un valor de identidad/grado porcentual. Se aplica el mismo procedimiento para comparar dos regiones variables con respecto a su grado de identidad, haciendo los cambios necesarios. La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.

20 Las secuencias de H-CDR1 mostradas en SEQ ID NO. 14 y 20 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la H-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 29.

Las secuencias de H-CDR2 mostradas en SEQ ID NO. 15 y 21 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la H-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 30.

25 Las secuencias de H-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 16 y 22 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la H-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 31.

30 Las secuencias de L-CDR1 mostradas en SEQ ID NO. 17 y 23 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la L-CDR1 mostrada en SEQ ID NO. 32.

Las secuencias de L-CDR2 mostradas en SEQ ID NO. 18 y 24 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la L-CDR2 mostrada en SEQ ID NO. 33.

35 Las secuencias de L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 19 y 25 son secuencias de especies a modo de ejemplo de la L-CDR3 mostrada en SEQ ID NO. 34.

Por consiguiente, en el presente documento se proporciona una molécula de reconocimiento con un segundo dominio de unión (que se une al receptor IIB de Fc gamma) que

40 (a) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestran en SEQ ID NO. 14, 15 y 16 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 17, 18 y 19; o

45 (b) comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestran en SEQ ID NO. 20, 21 y 22 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 23, 24 y 25,

50 en la que dicha molécula de reconocimiento aumenta preferiblemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento.

55 Una molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma) con un segundo dominio de unión que comprende en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestran en SEQ ID NO. 14, 15 y 16 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 17, 18 y 19, o que tienen en su región variable de cadena pesada H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 tal como se muestran en SEQ ID NO. 20, 21 y 22 y en su región variable de cadena ligera L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 mostradas en SEQ ID NO. 23, 24 y 25 es una molécula de reconocimiento a modo de ejemplo. Una molécula de reconocimiento de este tipo a modo de ejemplo aumenta preferiblemente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de células Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento.

60 En una realización, la molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma) tiene un segundo dominio de unión que contiene al menos (i) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1 y (ii) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 65% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 2.

65

Además, la molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma) puede tener un segundo dominio de unión que contiene al menos uno de (i) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3 y (ii) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 4.

Tales moléculas de reconocimiento aumentan la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de las células Daudi aproximadamente de 4 a 10 veces en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento. La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.

Tal como se describió anteriormente, una molécula de reconocimiento a modo de ejemplo es un anticuerpo. Un anticuerpo divulgado es uno que se une con un primer dominio de unión, que es al menos una porción de un dominio Fab, al receptor de Fc épsilon, es decir, un anticuerpo anti-Fc ϵ R, preferiblemente del tipo IgG, y con un segundo dominio de unión, que es una región constante de IgG o una porción de la misma que está unida por el receptor IIB de Fc gamma a un receptor IIB de Fc gamma.

Otro anticuerpo divulgado se une con un primer dominio de unión que es al menos una porción de un dominio Fab al receptor de Fc épsilon y con el segundo dominio de unión que es al menos una porción de un dominio Fab al receptor IIB de Fc gamma, es decir, un anticuerpo anti-Fc ϵ R x anticuerpo anti-Fc γ RIIB bifuncional o biespecífico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no se une al receptor IIA de Fc gamma (Fc γ RIIA).

También se divulga un anticuerpo que comprende un dominio Fc de IgE o una porción del mismo como primer dominio de unión y un dominio Fc de IgG o una porción del mismo como segundo dominio de unión.

Otro anticuerpo a modo de ejemplo es uno que se une con un primer dominio de unión, que es una región constante de IgE o una porción de la misma que está unida por un receptor de Fc épsilon a un receptor de Fc épsilon, y con un segundo dominio de unión, que es al menos una porción de un dominio Fab, al receptor IIB de Fc gamma, es decir, un anticuerpo anti-Fc γ RIIB, preferiblemente del tipo IgG. En determinadas realizaciones, el anticuerpo no se une al receptor IIA de Fc gamma (Fc γ RIIA). La molécula de reconocimiento de la invención es un anticuerpo tal como se define en la reivindicación 1.

Un "anticuerpo" cuando se usa en el presente documento es una proteína que comprende uno o más polipéptidos (que comprende uno o más dominios de unión, preferiblemente dominios de unión a antígeno) codificados sustancial o parcialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en el presente documento. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como innumerables genes de la región variable de inmunoglobulina. En particular, un "anticuerpo" cuando se usa en el presente documento es normalmente una proteína glicosilada tetramérica que se compone de dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Pueden encontrarse dos tipos de cadena ligera, denominadas lambda y kappa, en los anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a cinco clases principales: A, D, E, G y M, y varias de estas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2, prefiriéndose IgG o IgE en determinadas realizaciones de la presente divulgación. Un anticuerpo IgM consiste en 5 unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades básicas de 4 cadenas que pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de unos 150.000 Dalton. Cada cadena ligera incluye un dominio variable (V) N-terminal (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada incluye un dominio V (VH) N-terminal, tres o cuatro dominios C (CH) y una región de bisagra. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero pueden presentar diversas funciones efectoras, tales como participación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Si un anticuerpo ejerciera ADCC, es preferiblemente del subtipo IgG1, mientras que el subtipo IgG4 no tendría la capacidad de ejercer ADCC. El dominio constante de una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, puede ser de cada subtipo tal como se describe en el presente documento, prefiriéndose el subtipo IgG o IgE, más preferiblemente del subtipo IgE.

Cuando se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" no sólo se refiere a una inmunoglobulina (o un anticuerpo intacto), sino que también se refiere a un fragmento de la misma, y abarca cualquier polipéptido que comprende un fragmento de unión a antígeno o un dominio de unión a antígeno tal como Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv, scFv, Fd, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y otros fragmentos de anticuerpos que retienen la función de unión a antígeno tal como se describe en el presente documento. Normalmente, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno y tendrían las mismas propiedades que los anticuerpos descritos en el presente documento.

El término "anticuerpo" también incluye, pero no se limita a, anticuerpos monoclonales, monoespecíficos, poli o multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, humanizados, camelizados, humanos, monocatenarios,

quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, injertados y generados *in vitro*, prefiriéndose los anticuerpos quiméricos o humanizados. El término “anticuerpo humanizado” se define comúnmente para un anticuerpo en el que la especificidad que codifica para las CDR de HC y LC se ha transferido a regiones de entramado variables humanas apropiadas (“injerto de CDR”). El término “anticuerpo” también incluye scFv, anticuerpos de cadena sencilla, 5 diácuerpos o tetracuerpos, anticuerpos de dominio (dAc) y nanocuerpos. En cuanto a la presente invención, el término “anticuerpo” también comprenderá anticuerpos bi, tri o multiméricos o bi, tri o multifuncionales que tienen varios sitios de unión a antígeno, preferiblemente al menos uno de ellos es un sitio de unión específico de Fc γ RIIB.

Además, el término “anticuerpo” tal como se emplea en el presente documento también se refiere a derivados de los 10 anticuerpos (incluyendo fragmentos) descritos en el presente documento. Un “derivado” de un anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de sustituciones, deleciones o adiciones de residuos de aminoácidos. Además, un derivado abarca anticuerpos que se han modificado mediante una unión covalente de una molécula de cualquier tipo al anticuerpo o a la proteína. Los ejemplos de tales moléculas incluyen 15 azúcares, PEG, grupos hidroxilo, etoxilo, carboxilo o amina, pero no se limitan a estos. En efecto, las modificaciones covalentes de los anticuerpos conducen a la glicosilación, pegilación, acetilación, fosforilación, amidación, sin limitarse a estas.

El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo “aislado”. “Aislado” cuando se usa para describir los anticuerpos divulgados en el presente documento, significa un anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado a partir 20 de un componente de su entorno de producción. Preferiblemente, el anticuerpo aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como el que resulta de las células transfectadas recombinantes, son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros 25 solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. Normalmente, sin embargo, se preparará un anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “se une específicamente” se refiere a moléculas de 30 reconocimiento, preferiblemente anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, que se unen específicamente a Fc γ RIIB o un fragmento del mismo y no se unen específicamente a otros receptores de Fc. La molécula de reconocimiento, preferiblemente los anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, se unen a Fc γ RIIB a través del segundo dominio de unión, por ejemplo, a través del dominio variable del anticuerpo. Sin embargo, estas moléculas de reconocimiento, tales como anticuerpos, también pueden unirse por el RIIB de Fc gamma, por ejemplo, a través de 35 su dominio Fc.

El apareamiento de una VH y VL juntas forma un único sitio de unión a antígeno. El dominio CH más próximo a VH se designa como CH1. Cada cadena L se liga a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las 40 dos cadenas H se ligan entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones de entramado (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los residuos responsables de las interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. Por 45 consiguiente, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1 o H-CDR1, H2 o H-CDR2 y H3 o H-CDR3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1 o L-CDR1, L2 o L-CDR2 y L3 o L-CDR3.

El término “variable” se refiere a las porciones de los dominios de inmunoglobulina que presentan variabilidad en su 50 secuencia y que están implicados en la determinación de la especificidad y la afinidad de unión de un anticuerpo particular (es decir, el/los “dominio(s) variable(s)”). La variabilidad no se distribuye uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos; se concentra en subdominios hipervariables de cada una de las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos subdominios hipervariables se denominan “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), de las cuales tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena ligera (L1-CDR, L2-CDR y L3-CDR) y tres constituyen el carácter de unión de una región variable de cadena pesada (H1- 55 CDR, H2-CDR y H3-CDR). Las CDR contribuyen a la actividad funcional de una molécula de anticuerpo y están separadas por secuencias de aminoácidos que comprenden andamiaje o regiones de entramado. Los límites y las longitudes de CDR definitorios exactos están sujetos a diferentes sistemas de clasificación y numeración. Las CDR pueden, por tanto, denominarse por Kabat, Chothia, contacto o cualquier otra definición de límites, incluyendo el sistema de numeración descrito en el presente documento. A pesar de los límites diferentes, cada uno de estos 60 sistemas tiene cierto grado de superposición en lo que constituye las denominadas “regiones hipervariables” dentro de las secuencias variables. Por tanto, las definiciones de CDR según estos sistemas pueden diferir en longitud y áreas de límite con respecto a la región de entramado adyacente. Véase, por ejemplo, Kabat, Chothia y/o MacCallum *et al.*, (Kabat *et al.*, citado anteriormente; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol, 1987, 196: 901; y MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol, 1996, 262: 732) Sin embargo, se prefiere la numeración según el denominado sistema de Kabat. 65

Las regiones variables a modo de ejemplo del segundo dominio (que se une al receptor IIB de Fc gamma) de una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, se muestran en SEQ ID NO. 1, 2, 3 y 4.

5 El término "región de entramado" se refiere a las porciones reconocidas en la técnica de una región variable de anticuerpo que existe entre las CDR más divergentes (es decir, hipervariables). Tales regiones de entramado se denominan normalmente regiones de entramado 1 a 4 (FR1, FR2, FR3 y FR4) y proporcionan un armazón para la presentación de las seis CDR (tres de la cadena pesada y tres de la cadena ligera) en un espacio tridimensional, para formar una superficie de unión a antígeno.

10 Las moléculas de reconocimiento (que se unen al receptor IIB de Fc gamma), tales como anticuerpos (incluyendo fragmentos y derivados de los mismos), aumentan ventajosamente la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de las células Daudi aproximadamente 1,5, 2, 3 o más veces, tal como aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más, o aproximadamente 10 veces (es decir, incluso casi 10 veces) en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento. Para esa comparación, el anticuerpo se usa en una cantidad dentro del intervalo de 5 μ g/ml a 50 μ g/ml, tal como 10, 15, 20 ó 25 μ g/ml.

20 A partir de los resultados mostrados en las figuras 6, 7 y 8, es evidente que el anticuerpo 8A6 quimérico (ch8A6) (que comprende regiones variables de rata y una región constante humana) o el anticuerpo 8A6 humanizado (hu8A6) aumentan notablemente la fosforilación de ITIM en comparación con el anticuerpo de la técnica anterior GB3. Teniendo en cuenta que las CDR entre los anticuerpos 8A6 quiméricos y humanizados son casi idénticas, mientras que sus regiones de entramado (FR) son diferentes, y la potencia de ambos anticuerpos para aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB es casi la misma (véase la figura 8), es razonable concluir que las CDR son causantes de una propiedad ventajosa de los anticuerpos divulgados en el presente documento para aumentar notablemente la fosforilación de ITIM, por ejemplo, en comparación con el anticuerpo GB3 de la técnica anterior.

30 El experto está fácilmente en condiciones de injertar las CDR tal como se describe en el presente documento para el segundo dominio de unión de una molécula de reconocimiento en una región de entramado apropiada o, viceversa, regiones de entramado de injerto en un segundo dominio de unión de una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo que tiene las CDR tal como se describe en el presente documento de modo que la molécula de reconocimiento resultante de este modo, tal como un anticuerpo, tiene las propiedades ventajosas, en particular la propiedad de aumentar la fosforilación de ITIM de CD32B tal como se describe en el presente documento.

35 Tal como se mencionó, las moléculas de reconocimiento, tales como los anticuerpos divulgados en el presente documento, tienen la propiedad de aumentar la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB (CD32B) de las células Daudi en comparación con el anticuerpo GB3 de la técnica anterior descrito en el documento WO 2005/051999, que se caracteriza por tener la región variable de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO. 7 del documento WO 2005/051999 (véase SEQ ID NO. 26) y la región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO. 5 del documento WO 2005/051999 (véase SEQ ID NO. 27).

40 El aumento en la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB (CD32B) de las células Daudi efectuado por una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, es de aproximadamente 4 veces o más, aproximadamente 5 veces o más, aproximadamente 6 veces o más, aproximadamente 7 veces o más, aproximadamente 8 veces o más, aproximadamente 9 veces o más, o aproximadamente 10 veces (es decir, incluso casi 10 veces) en comparación con las células Daudi no tratadas con dicha molécula de reconocimiento.

La fosforilación de ITIM de CD32B (receptor IIB de Fc gamma) de las células Daudi se determina preferiblemente de la siguiente manera:

50 3x10⁵ células Daudi suspendidas en medio RPMI 1640 suplementado con FBS al 1% (suero bovino fetal) se dejan o bien sin tratar (control) o bien se incuban durante 25 minutos a 37°C, el 5% de CO₂ con una mezcla de anticuerpos que contiene anticuerpo de ratón anti-IgM humana (α -hIgM) y anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (α -mIgG), en la que la mezcla de anticuerpos comprende α -hIgM 2 μ g/ml (AcM, clon UHB) y α -mIgG 20 μ g/ml. Posteriormente, las células se tratan o bien 20 minutos a 37°C, el 5% de CO₂ con una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo divulgado en el presente documento, o bien con una molécula de interés tal como se define a continuación en el presente documento, tal como el anticuerpo GB3 del documento WO 2005/051999, respectivamente, tanto una molécula de reconocimiento como una molécula de interés se aplican preferiblemente a la misma concentración, y opcionalmente con tampón como control (w/o). Las células se recogen después de la incubación a 4°C, se lisan y se someten a análisis de inmunotransferencia de tipo Western (WB), mediante lo cual se detecta la fosforilación mediante un anticuerpo anti-fosfotirosina (anticuerpo anti-CD32B (fosfo Y292)). La inmunotransferencia de tipo Western se sondea opcionalmente con un anticuerpo que detecta, por ejemplo, β -actina que sirve como control de carga para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Como alternativa a las células Daudi, pueden usarse PBMC o células Raji. Por consiguiente, en todas las realizaciones que aplican células Daudi cuando se determina la fosforilación de ITIM, pueden reemplazarse las células Daudi por células Raji o PBMC.

65

El anticuerpo de fosfotirosina se acopla preferiblemente a un grupo generador de señal. Un grupo generador de señal se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen radiomarcadores tales como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I ; colorantes fluorescentes (por ejemplo, Cy-3, Cy-5); cromóforos, reactivos electrodenso; enzimas que generan una señal detectable (por ejemplo, tal como se usa comúnmente en un ELISA); o marcadores de espín. El marcador o resto detectable tiene o genera una señal medible, tal como una señal radiactiva, cromogénica o fluorescente, que puede usarse para cuantificar la cantidad de resto detectable unido en una muestra. El grupo generador de señal puede unirse de manera covalente o no covalente al anticuerpo de fosfotirosina. Una señal puede determinarse mediante la señal proporcionada por el grupo generador de señal de un anticuerpo de fosfotirosina. La señal puede ser cualquier señal que sea detectable, por ejemplo, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos.

Un aumento en la fosforilación de ITIM se determina comparando (i) la señal generada a partir del grupo generador de señal del anticuerpo de fosfotirosina unido al motivo ITIM de CD32B de células que no se trataron ("valor de referencia") con (ii) la señal generada a partir del grupo generador de señal del anticuerpo de fosfotirosina unido al motivo ITIM de CD32B de células que se trataron con una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo divulgado en el presente documento, por lo que si la señal (ii) es mayor que la señal (i), se efectuó un aumento en la fosforilación de ITIM de CD32B por una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento. Para esa comparación, se usa una molécula de reconocimiento en una cantidad dentro del intervalo de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$ a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$, tal como 10, 15, 20 ó 25 $\mu\text{g/ml}$. Por ejemplo, cuando se compara el anticuerpo GB3 de la técnica anterior o cualquier otra molécula tal como un anticuerpo que se une a CD32B (denominado en conjunto "molécula de interés"), tal como uno que se une al epítipo en CD32B tal como se describe en el presente documento y/o que no es bloqueante tal como se describe en el presente documento, con una molécula de reconocimiento con el fin de determinar la capacidad de una molécula de interés y una molécula de reconocimiento de aumentar la fosforilación de ITIM de CD32B, la fosforilación de ITIM se determina tal como se describió anteriormente para la molécula de interés y una molécula de reconocimiento. Concretamente, se obtiene un valor para la comparación de una molécula de interés con células sin tratar y un valor para la comparación de una molécula de reconocimiento con células sin tratar. Estos valores pueden compararse entre sí para determinar si una molécula de reconocimiento tiene la capacidad de aumentar la fosforilación de ITIM en mayor medida, tal como de 4 a 10 veces (incluyendo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), que una molécula de interés. Para esa comparación, se usan una molécula de interés y una molécula de reconocimiento en una cantidad dentro del intervalo de 5 $\mu\text{g/ml}$ a 50 $\mu\text{g/ml}$, tal como 10, 15, 20 ó 25 $\mu\text{g/ml}$.

Con respecto a la región variable de cadena pesada de un segundo dominio de unión (que se une al receptor IIB de Fc gamma) de una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento, en determinadas realizaciones, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 3, con al menos una de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por E, el aminoácido V en la posición 11 se reemplaza por L, el aminoácido G en la posición 42 se reemplaza por K, el aminoácido S en la posición 50 se reemplaza por V, el aminoácido Y en la posición 53 se reemplaza por S, el aminoácido K en la posición 58 se reemplaza por T, el aminoácido G en la posición 61 se reemplaza por A, el aminoácido S en la posición 75 se reemplaza por T, el aminoácido K en la posición 76 se reemplaza por R, el aminoácido N en la posición 77 se reemplaza por S y el aminoácido T en la posición 78 se reemplaza por N. Un anticuerpo de este tipo se caracteriza por comprender un dominio constante de IgE como primer dominio de unión.

En caso de que el segundo dominio de unión de una molécula de reconocimiento sea un dominio constante de IgG o una porción del mismo que está unido por el receptor IIB de Fc gamma, una molécula de reconocimiento se caracteriza por comprender la región constante de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6, y/o la región constante de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7.

En un anticuerpo divulgado en el presente documento, la región constante de cadena pesada contiene un residuo de alanina en la posición 297 (N297A) según la numeración de proteínas EU tal como se describe por Edelman *et al.* 1969 (corresponde a la numeración de la secuencia que está representada por SEQ ID NO. 6 tal como se muestra en la figura 2). Los anticuerpos con una cadena pesada que contienen un residuo de alanina (Ala, A) en la posición 297 (N297A) se designan en el presente documento con el sufijo "_N297A", mientras que los anticuerpos que tienen un residuo de asparagina (Asn, N) en dicha posición son de "tipo natural" y, por tanto, se designan en el presente documento con el sufijo "(wt)". Tal como puede observarse en la figura 2, la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8A6 humanizado de tipo natural termina con un residuo de aminoácido "S" en la posición 113 según la numeración de proteínas EU. La región constante de dicho anticuerpo comienza en la posición 118. El hueco aparente resultante de 4 residuos de aminoácidos está provocado por el cambio al sistema de numeración de proteínas EU para la región constante y no significa que falte ningún residuo de aminoácido. Tales dominios constantes que tienen un residuo de alanina en la posición 297 de la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO. 6 tienen una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo reducida o ausente debido a una unión reducida o inexistente de la parte Fc del anticuerpo a receptores de Fc. La secuencia de aminoácidos de una región constante N297A de este tipo se muestra en SEQ ID NO. 28. Por consiguiente, las moléculas de reconocimiento divulgadas en el presente documento pueden contener como región constante la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 28. Tales anticuerpos carecen de glicosilación en la posición 297 según la numeración de proteínas EU. Por tanto, en el presente

documento se divulgan anticuerpos que carecen de glicosilación en la posición 297 según la numeración de proteínas EU de la región constante de cadena pesada, y también abarcan anticuerpos que están glicosilados en la posición 297 según la numeración de proteínas EU de la región constante de cadena pesada.

5 En algunas realizaciones, el dominio constante (dominio Fc) de una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo divulgado en el presente documento, tiene el alotipo G1m17 que contiene los aminoácidos K (Lys) en la posición 214, E (Glu) en la posición 356, M (Met) en la posición 358 y A (Ala) en la posición 431, sin una K (Lys) C-terminal (Beck *et al.*, 2010).

10 En caso de que el segundo dominio de unión de una molécula de reconocimiento sea un dominio constante de IgG o una porción del mismo que esté unido por el receptor IIB de Fc gamma, el dominio ligero constante es del alotipo Km3 puede comprender los aminoácidos A (Ala) en la posición 153 y V (Val) en la posición 191.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "alotipo" se refiere al alotipo humano de los anticuerpos divulgados en el presente documento. Los alotipos son variantes alélicas/genéticas dentro de las secuencias de región constante de isotipos particulares. Los alotipos se heredan de manera alélica. Por tanto, los diferentes miembros de una especie diferirán entre sí con respecto a qué alelos particulares de un isotipo dado heredaron de sus progenitores. Km1 y Km2 son alotipos de cadenas kappa humanas; G1m(4) y G1m(17) son alotipos de cadenas gamma-1 humanas.

20 En caso de que el segundo dominio de unión de una molécula de reconocimiento sea un dominio constante de IgG o una porción del mismo que esté unido por el receptor IIB de Fc gamma, una molécula de reconocimiento puede comprender la región constante de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6, y la región constante de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7. Una molécula de reconocimiento de este tipo se caracteriza por un primer dominio de unión que es un dominio constante de IgE o una porción del mismo que está unido por el receptor de Fc épsilon.

30 Con respecto a la región variable de cadena ligera de un segundo dominio de unión (que se une al receptor IIB de Fc gamma) de una molécula de reconocimiento, en algunas realizaciones comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 4, con al menos una de las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en que el aminoácido Q en la posición 1 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 28 se reemplaza por N, el aminoácido S en la posición 31 se reemplaza por T, aminoácido V en la posición 33 se reemplaza por L, el aminoácido D en la posición 34 se reemplaza por A, el aminoácido Y en la posición 49 se reemplaza por F, el aminoácido T en la posición 53 se reemplaza por N, el aminoácido Y en la posición 55 se reemplaza por A, el aminoácido L en la posición 89 se reemplaza por Q y el aminoácido N en la posición 93 se reemplaza por Y. Un anticuerpo de este tipo se caracteriza por comprender la región constante de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 6 y/o la región constante de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 7. Una molécula de reconocimiento de este tipo se caracteriza además por un primer dominio de unión que es un dominio constante de IgE o una porción del mismo que está unido por el receptor de Fc épsilon.

40 Una molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma), tal como un anticuerpo, comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 ó 3 y/o la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2 ó 4. Por consiguiente, una molécula de reconocimiento puede comprender la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 1 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 2, o comprende la región variable de cadena pesada mostrada en SEQ ID NO. 3 y la región variable de cadena ligera mostrada en SEQ ID NO. 4.

50 Una molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma), tal como un anticuerpo divulgado en el presente documento, se une específicamente a un epítipo dentro de los aminoácidos n.^{os} 20-40 de Fc γ RIIB humano según SEQ ID NO. 5. En algunas realizaciones, la molécula de reconocimiento se une específicamente a un epítipo que comprende el motivo GTHSPES en SEQ ID NO. 5. Este motivo de aminoácidos ha demostrado ser un epítipo muy específico de Fc γ RIIB. Las moléculas de reconocimiento, tales como los anticuerpos que se unen específicamente a este epítipo, no se unen a Fc γ RIIA humano. La unión de una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, a este epítipo a través de su(s) región/regiones variable(s) preferiblemente no interfiere con la unión de partes Fc de anticuerpos al receptor y no bloquea la función fisiológica normal del receptor.

55 En algunas realizaciones, la molécula de reconocimiento (que se une al receptor IIB de Fc gamma), tal como un anticuerpo, se une a Fc γ RIIB humano *in vitro* con una afinidad que tiene una tasa de disociación de al menos $4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Una constante de disociación (k_{off}) puede medirse mediante experimentos de resonancia de plasmón superficial. Especialmente, la unión de anticuerpos a sFc γ RIIB puede analizarse mediante resonancia de plasmón superficial usando un biosensor BIAcore T200 (GE Healthcare/Biacore).

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "afinidad" se refiere a la fuerza de unión entre las regiones variables de una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo y su antígeno (por ejemplo, el receptor Fc γ RIIB) y se mide *in vitro*. La afinidad determina la fuerza de la interacción entre un epítipo y el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. La afinidad puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$KA = [AB-AG]/[AB]*[AG] = k_{on}/k_{off}$$

en la que:

- 5 KA = constante de afinidad
- [AB] = concentración molar de sitios de unión desocupados en el anticuerpo
- 10 [AG] = concentración molar de sitios de unión desocupados en el antígeno
- [AB-AG] = concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno
- 15 Tal como se usa en el presente documento, el término “avidez” se refiere a la medición de la fuerza global de un complejo anticuerpo-antígeno, que en efecto depende de los parámetros (1) afinidad del anticuerpo por el epítipo, (2) valencia del anticuerpo y antígeno y (3) la disposición estructural de las partes que interaccionan.
- Se prevé que una molécula de reconocimiento, que es preferiblemente un anticuerpo, pueda estar glicosilada o desglicosilada.
- 20 En caso de que el primer dominio de unión de una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento sea un dominio constante de IgE o una porción del mismo que está unido por el receptor de Fc épsilon, puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35 ó 36 o una porción de la misma.
- 25 Una porción preferida de un dominio Fc de IgE comprende el dominio Cε3 y/o el dominio Cε4 (véase la figura 15 y la SEQ ID NO. 36). Estos dominios son homólogos con Cγ2 y Cγ3 de IgG. En un anticuerpo IgG, la región de bisagra es responsable de la flexibilidad requerida de la molécula y de la formación del dímero a través de puentes disulfuro. Esta región de bisagra no existe en el anticuerpo IgE. En lugar de eso, el dominio adicional Cε2 adopta esta función.
- 30 Otras porciones a modo de ejemplo de un dominio Fc de IgE comprenden el dominio Cε2, Cε3 y/o Cε4 (véase la figura 15 y SEQ ID NO. 35).
- Otra variación se refiere a la cantidad diferente de sitios de N-glicosilación en el dominio Fcε. Se describen varios sitios de glicosilación para la molécula de IgE: N265, N371, N383 y N394. Se prevé que uno o más de estos sitios permanezcan tal cual o estén mutados de manera que ya no puedan glicosilarse.
- 35 Además, en algunas realizaciones, una molécula de reconocimiento, tal como un anticuerpo, comprende como primer dominio de unión un dominio Fc de IgE y puede unirse *in vitro* a FcεRI humano con una afinidad que tiene al menos $1,2 \times 10^{-7}$ Kd (M). La molécula de reconocimiento de la invención se define en la reivindicación 1.
- 40 También se proporcionan en el presente documento secuencias de ácido nucleico que codifican para la molécula de reconocimiento descrita en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, los términos “ácidos nucleicos” o “secuencias de nucleótidos” se refieren a moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), ARN (ARNm), combinaciones de los mismos o moléculas híbridas compuestas por ADN y ARN. Los ácidos nucleicos pueden ser bicatenarios o monocatenarios y pueden contener fragmentos bicatenarios y monocatenarios al mismo tiempo. Las más preferidas son las moléculas de ADN bicatenarias. Por consiguiente, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de reconocimiento divulgada comprende nucleótidos que codifican para al menos aquellas partes del anticuerpo que confieren las propiedades de unión específicas del anticuerpo. En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico divulgadas codifican para las regiones variables, tales como al menos las CDR tal como se describe en el presente documento. Las secuencias de ácido nucleico a modo de ejemplo están representadas por SEQ ID NO. 8 - 11. Un experto en la técnica sería consciente de que estas secuencias de nucleótidos pueden variar dependiendo de los métodos de expresión empleados y los sistemas usados para ello.
- 50 Además se proporciona en el presente documento un vector de ácido nucleico que comprende al menos una de las secuencias de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento que codifica para una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento. El vector comprende preferiblemente un promotor bajo el control del cual se colocan las secuencias de ácido nucleico anteriores. El vector puede ser un vector de expresión procariota o eucariota, en el que el ácido nucleico recombinante se expresa o bien sólo o bien en fusión con otros péptidos o proteínas.
- 60 También se divulga en el presente documento una célula huésped que se transfecta con el vector mencionado anteriormente. La célula huésped puede ser cualquier célula, una célula procariota o una célula eucariota, y puede usarse para producir al menos partes de un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo.
- 65 También se proporciona un método para la producción de una molécula de reconocimiento, que comprende cultivar

una célula huésped tal como se describe en el presente documento en condiciones que permiten la expresión de la secuencia de ácido nucleico comprendida por el vector de ácido nucleico y recuperar la molécula de reconocimiento así producida.

5 Las moléculas de reconocimiento divulgadas en el presente documento pueden usarse ventajosamente en una composición farmacéutica. Tal composición farmacéutica puede aplicarse para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades asociadas con basófilos, preferiblemente enfermedades alérgicas.

10 Por consiguiente, también se proporcionan métodos de tratamiento o profilaxis de enfermedades asociadas con basófilos, preferiblemente enfermedades alérgicas, comprendiendo dicho método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de reconocimiento divulgada en el presente documento a un sujeto que lo necesita.

15 “Enfermedad alérgica” o “alergia” se refiere a determinadas enfermedades en las que las respuestas inmunitarias a los antígenos ambientales provocan inflamación de los tejidos y disfunción orgánica. Un alérgeno es cualquier antígeno que provoca alergia. Como tal, puede ser o bien la propia molécula antigénica o bien su fuente, tal como el grano de polen, la caspa de animales, el veneno de insectos o el producto alimenticio. La IgE desempeña un papel central en los trastornos alérgicos. Los receptores de IgE de alta afinidad (Fc ϵ RI) se encuentran en mastocitos y basófilos, que sirven como dianas antigénicas que estimulan la liberación adicional de mediadores inflamatorios que producen muchas de las manifestaciones de la enfermedad alérgica.

20 El término “enfermedad alérgica” también abarca inflamación mediada por IgE. La “inflamación mediada por IgE” se produce cuando el antígeno se une a los anticuerpos IgE que ocupan el receptor Fc ϵ RI en los mastocitos. En cuestión de minutos, esta unión hace que los mastocitos se desgranulen, liberando determinados mediadores preformados. Posteriormente, la célula desgranulada comienza a sintetizar y liberar mediadores adicionales *de novo*. El resultado es una respuesta de dos fases: un efecto inicial inmediato sobre los vasos sanguíneos, el músculo liso y la secreción glandular (hipersensibilidad inmediata), seguido de unas pocas horas más tarde por infiltración celular del sitio afectado. La inflamación mediada por IgE es el mecanismo subyacente a la alergia atópica (tal como fiebre del heno, asma y dermatitis atópica), reacciones anafilácticas sistémicas y urticaria alérgica (ronchas). Normalmente puede desempeñar un papel como primera línea de defensa inmunológica, ya que provoca una rápida vasodilatación, facilitando la entrada de células y factores solubles circulantes en el sitio de contacto con el antígeno. Muchos de los atributos más destructivos de la enfermedad alérgica se deben a las acciones de los leucocitos quimioatraídos.

25 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende como principio activo una molécula de reconocimiento. Dicha composición farmacéutica puede comprender al menos un vehículo o adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las moléculas de reconocimiento pueden proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como se conoce en la técnica o tal como se enumera en una farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

30 La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. Las composiciones pueden formularse como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, aquellas formadas con aniones tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con cationes tales como los derivados de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

35 La composición farmacéutica mencionada anteriormente puede usarse para el tratamiento o la profilaxis o el diagnóstico de cualquier enfermedad o trastorno, preferiblemente de enfermedades asociadas con basófilos, preferiblemente enfermedad alérgica.

40 Las cantidades de dosificación y las frecuencias de administración están abarcadas por los términos terapéuticamente eficaz y profilácticamente eficaz. La dosificación y la frecuencia de administración variarán normalmente además según los factores específicos de cada paciente dependiendo de los agentes terapéuticos o profilácticos específicos administrados, el tipo de enfermedad, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta y la historia médica anterior del paciente. Los regímenes adecuados pueden seleccionarse por un experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del componente o agente activo terapéutico que es suficiente para tratar o mejorar una enfermedad o un trastorno, para retrasar la aparición de una enfermedad o que proporciona algún beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad.

45 Para los anticuerpos que son moléculas de reconocimiento a modo de ejemplo abarcadas en el presente documento, la dosificación administrada a un paciente es normalmente de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. Las dosis administradas a modo de ejemplo son de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a

aproximadamente 75 mg/kg, de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg, de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 12 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 17 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg o aproximadamente 25 mg/kg. Se conoce bien que los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies. Por tanto, la dosificación y la frecuencia de administración de anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, pueden reducirse en comparación con las dosificaciones usadas normalmente de anticuerpos de otras especies.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de anticuerpos, o un fragmento o derivado de los mismos, puede incluir un solo tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En determinados aspectos divulgados, un sujeto puede tratarse con anticuerpos, o fragmentos o derivados de los mismos, en un intervalo de dosis divulgado anteriormente, una vez por semana durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 semanas, más preferiblemente entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7 semanas. La forma y la manera de aplicación más ventajosas pueden elegirse para beneficiar mejor al paciente que va a tratarse. Los métodos de administración de un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural y mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En un aspecto divulgado específico, los anticuerpos se administran por vía intramuscular, intravenosa o subcutánea. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente pulverizante. Tal como se usa en el presente documento, el término "tratar" y "tratamiento" se refiere a administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de la composición farmacéutica o del anticuerpo que es suficiente para tratar o mejorar una enfermedad o un trastorno, para retrasar la aparición de una enfermedad o para proporcionar algún beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, el término "profilaxis" se refiere al uso de un agente para la prevención de la aparición de una enfermedad o un trastorno. Una "cantidad eficaz profiláctica" define una cantidad del componente activo o agente farmacéutico suficiente para prevenir la aparición o recaída de una enfermedad. Tal como se usa en el presente documento, los términos "trastorno" y "enfermedad" se usan de manera intercambiable para referirse a un estado en un sujeto. En particular, el término "enfermedad autoinmunitaria" se usa de manera intercambiable con el término "trastorno autoinmunitario" para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por una lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto a sus propias células, tejidos y/u órganos.

Además, los anticuerpos divulgados pueden usarse con fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades o trastornos, en particular enfermedades autoinmunitarias. Los anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos pueden usarse para analizar los niveles de Fc γ RIIB en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos tal como se describe en el presente documento o tal como conocen los expertos en la técnica (por ejemplo, véase Jalkanen *et al.*, 1985, J. Cell. Biol. 101: 976-985; Jalkanen *et al.*, 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Por tanto, la presente divulgación se refiere además a una composición de diagnóstico que comprende una molécula de reconocimiento, preferiblemente un anticuerpo divulgado en el presente documento.

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Secuencias

SEQ ID NO. 1: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata

SEQ ID NO. 2: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata

SEQ ID NO. 3: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6

SEQ ID NO. 4: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6

SEQ ID NO. 5: secuencia de aminoácidos de Fc γ RIIB humano

SEQ ID NO. 6: secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6_{wt}

SEQ ID NO. 7: secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6_{wt}

ES 2 802 176 T3

- SEQ ID NO. 8: secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- 5 SEQ ID NO. 9: secuencia de ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- SEQ ID NO. 10: secuencia de ácido nucleico que codifica para la región constante de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6_wt
- 10 SEQ ID NO. 11: secuencia de ácido nucleico que codifica para la región constante de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6_wt
- SEQ ID NO. 12: secuencia de aminoácidos de Fc γ R1IA soluble humano (sFc γ R1IA)
- 15 SEQ ID NO. 13: secuencia de aminoácidos de Fc γ R1IA soluble humano mutado (sFc γ R1IAmut)
- SEQ ID NO. 14: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
- 20 SEQ ID NO. 15: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
- SEQ ID NO. 16: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
- 25 SEQ ID NO. 17: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
- SEQ ID NO. 18: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
- 30 SEQ ID NO. 19: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
- SEQ ID NO. 20: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- 35 SEQ ID NO. 21: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- SEQ ID NO. 22: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado hu8A6
- 40 SEQ ID NO. 23: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- SEQ ID NO. 24: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- 45 SEQ ID NO. 25: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado hu8A6
- 50 SEQ ID NO. 26: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo GB3 (véase también SEQ ID NO. 7 del documento WO 2005/051999)
- SEQ ID NO. 27: secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo GB3 (véase también SEQ ID NO. 5 del documento WO 2005/051999)
- 55 SEQ ID NO. 28: secuencia de aminoácidos de una región constante de cadena pesada que contiene en la posición 297 una sustitución de N por A (suponiendo que la posición 1 de la secuencia tal como se muestra en la lista de secuencias sea la posición 118)
- 60 SEQ ID NO. 29: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- SEQ ID NO. 30: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado
- 65 SEQ ID NO. 31: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena pesada que comprende residuos

de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

SEQ ID NO. 32: secuencia de aminoácidos de CDR1 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

5 SEQ ID NO. 33: secuencia de aminoácidos de CDR2 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

10 SEQ ID NO. 34: secuencia de aminoácidos de CDR3 de la región variable de cadena ligera que comprende residuos de aminoácidos clave del anticuerpo 8A6 quimérico y humanizado

SEQ ID NO. 35: secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgE que contiene los dominios 2, 3 y 4

15 SEQ ID NO. 36: secuencia de aminoácidos del dominio Fc de IgE que contiene los dominios 3 y 4

SEQ ID NO. 37: secuencia de ADN plasmídico de sFcεRIα

SEQ ID NO. 38: secuencia de aminoácidos del péptido formil-metionina-leucina-fenilalanina

20 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: análisis de resonancia de plasmón superficial de 8A6 humanizado según SEQ ID NO. 3 y 4 en formato o bien de tipo natural (wt) o bien N297A, ch8A6_N297A (según SEQ ID NO. 14 y 15) y chGB3_N297A.

25 Figura 2: secuencias de hu8A6_wt y hu8A6_N297A que representan la posición del intercambio de aminoácidos de N por A en formato N297A.

30 Figura 3: característica no bloqueante de ch8A6_N297A. Se incubaron células Raji con una cantidad establecida de IgG humana agregada y cantidades variables de ch8A6_N297A, chGB3_N297A o anticuerpos bloqueantes 2B6 o Ac de R&D. Los anticuerpos no son bloqueantes.

35 Figura 4: unión desde 15 µg/ml hasta 0,005 µg/ml de anticuerpo purificado con proteína A (hu8A6_VL + hu8A6_VH y ch8A6_N297A) a FcγRIIB nativo expresado en células Raji. Las variantes de 8A6 humanizadas se unen con gran avidez a FcγRIIB expresado en células Raji.

Figura 5: unión de 15 µg/ml de anticuerpo (hu8A6_VH + hu8A6_VL y ch8A6_N297A) a FcγRIIA nativo expresado en células K562. Los anticuerpos no se unen a FcγRIIA en K-562.

40 Figura 6a: la fosforilación de ITIM aumentó por 8A6 quimérico (ch8A6_N297A) en PBMC de un donante sano. Se aislaron PBMC de donantes sanos usando la separación de Ficoll y posteriormente se dejaron sin tratar o se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien 20 minutos con 5 µg/ml de ch8A6_N297A o bien tampón como control (w/o). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β-actina = control de carga.

45 Figura 6b: experimento de control para la fosforilación de ITIM. Las células Daudi se dejaron sin tratar o se trataron durante 25 minutos con un anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo anti-IgM policlonal anti-humano (anti-hIgM policlonal), anticuerpo anti-IgM humana monoclonal (anti-hIgM), anti-hIgM + ch8A6_N297A 5 µg/ml, anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (α-IgG de ratón), α-IgG de ratón + ch8A6_N297A 5 µg/ml, mezcla de anticuerpo anti-hIgM y anticuerpo α-IgG de ratón (mezcla de Ac) o mezcla de Ac + ch8A6_N297A 5 µg/ml. β-actina = control de carga.

Figura 6c: los anticuerpos de la presente invención potencian la fosforilación de ITIM con y sin reticulación/coligamiento de BCR y RIIB de Fc gamma (FcγRIIB) en PBMC primarias.

55 Figura 7: comparación de ch8A6_N297A con anticuerpo del estado de la técnica (chGB3_N297A). Se incubaron células Daudi humanas durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo) o se dejaron sin tratar. Posteriormente, las células se trataron o bien durante 20 minutos con cantidades variables de chGB3_N297A o ch8A6_N297A o bien tampón como control (w/o). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β-actina = control de carga.

60 Figura 8: comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A y chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM en PBMC primarias. Después de la reticulación de BCR y FcγRIIB por la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 µg/ml y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de ITIM. β-actina = control de carga.

- 5 Figura 9: coimmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilada con ITIM de Fc γ RIIB. Después de la estimulación de las células Daudi con la mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIIB 2B6 o chGB3_N297A (5 μ g/ml), se precipitó Fc γ RIIB de los lisados celulares y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosfatasa SHIP-1. Anticuerpo anti-CD32 que usa anticuerpo anti-CD32 de bandeja (AF1330) = control de carga.
- 10 Figura 10: comparación de las variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2 / VH10 + VL6 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7) con ch8A6_N297A. Las células Daudi se dejaron incubar durante 25 minutos con tampón (sin tratar) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien 20 minutos con 0,25 μ g/ml de ch8A6_N297A o bien variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2 / VH10 + VL6 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β -actina = control de carga.
- 15 Figura 11: comparación de variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2 / VH10 + VL6 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7) con ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIIB y chGB3_N297A. Las células Daudi se dejaron incubar durante 25 minutos con tampón (sin tratar) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien durante 20 minutos con 0,25 μ g/ml de ch8A6_N297A, variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2 / VH10 + VL6 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7), anticuerpo bloqueante anti-Fc γ RIIB 2B6 o bien chGB3_N297A. Las células se recogieron después de la incubación, se lisaron según el protocolo y se analizaron en un ensayo de inmunotransferencia de tipo Western. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β -actina = control de carga.
- 20 Figura 12: configuración experimental para el modelo de ratón de PBL de LES. Se transfieren PBL de pacientes humanos con LES a ratones inmunosuprimidos. Se injertan las células PBL y los ratones se tratan posteriormente con control (PBS) o anticuerpo anti-Fc γ RIIB ch8A6_N297A según la invención.
- 25 Figura 13: nivel total de IgG humana [μ g/ml] en ratones injertados con PBL de donantes humanos que padecen LES. Se representan ratones tratados con control (n.º 2, PBS) o ch8A6_N297A (n.º 3 y n.º 4).
- 30 Figura 14: reducción del anticuerpo IgG anti-ADN humano específico de la enfermedad en ratones tratados con ch8A6_N297A a partir de la semana 4 después de la transferencia/injerto de PBL de LES usando PBL de donantes humanos que padecen LES. Se muestran títulos de anticuerpo IgG anti-ADN en dos ratones diferentes, n.º 3 y n.º 4 (tratados con ch8A6_N297A), el n.º 2 muestra el control de PBS.
- 35 Figura 15: constructos que se componen del dominio Fab del anticuerpo IgG específico de Fc γ RIIB quimérico y el dominio Fc ϵ de un anticuerpo IgE. Los constructos difieren con respecto al cambio de Fab basado en IgG y el dominio Fc ϵ (B. con dominio C ϵ 2, C. sin C ϵ 2 pero con región de bisagra de IgG) y la cantidad de sitios de N-glicosilación. Para comparar, se muestra un esquema de una molécula de IgG completa y una de IgE completa (A).
- 40 Figura 16: unión de 8A6-IgE a SM101 (sFc γ RIIB) sometida a prueba mediante ELISA. La figura representa un ELISA representativo. Las variantes de ch8A6-IgE tienen la misma afinidad con el antígeno SM101 (Fc γ RIIB soluble) que el anticuerpo quimérico anti-RIIB de Fc gamma.
- 45 Figura 17: unión de variantes 8A6_IgE a sFc ϵ RI α determinada mediante ELISA. La figura representa un ELISA representativo. Las variantes humanizadas de IgE anti-RIIB de Fc gamma se unen a sFc ϵ RI α con la misma afinidad que la versión quimérica de IgE anti-RIIB de Fc gamma respectiva.
- 50 Figura 18: unión celular del anticuerpo anti-Fc γ RIIB-IgE a Fc γ RIIB expresado en Raji. La figura representa un experimento de FACS representativo, realizado con las variantes 8A6_c ϵ 2-4degly y 8A6_c ϵ 3-4degly, en comparación con ch8A6_N297A. Ambas variantes de 8A6-IgE así como ch8A6_N297A tienen la misma afinidad con el antígeno Fc γ RIIB nativo.
- 55 Figura 19: unión de 8A6-IgE a SM101 sometida a prueba mediante ELISA. La figura representa un ELISA representativo. Las variantes de 8A6-IgE humanizadas tienen la misma afinidad con el antígeno SM101 (Fc γ RIIB soluble) que el anticuerpo quimérico anti-receptor IIB de Fc gamma.
- 60 Figura 20: unión de variantes de 8A6-IgE a sFc ϵ RI α determinada mediante ELISA. La figura representa un ELISA representativo. Las variantes humanizadas de IgE anti-RIIB de Fc gamma se unen a sFc ϵ RI α con la misma afinidad que la versión quimérica de IgE anti-RIIB de Fc gamma respectiva.
- Figura 21: prueba de unión de 8A6-IgE-Fluo488 marcado en células Raji. Se sometió a prueba la unión del constructo

marcado fluorescente a Fc γ RIIB en células Raji y las células CHO (Fc γ RIIB neg.) sirvieron como control. Se evaluó la fluorescencia en el canal de FITC.

5 Figura 22: unión de ch8A6_ce2-4-degly y ch8A6_N297A a células B dentro de PBMC. Análisis de FACS de la unión de 8A6-IgE (fila izquierda), 8A6-IgE enmascarado con SM101 (fila central) y 8A6-IgG (fila derecha) a células B. En los puntos de tiempo indicados en el lado derecho, las células B se analizaron después de la tinción con α -hCD19-PeCy7 para determinar la unión de 8A6-IgE mediante análisis de FACS. Los números en el cuadrante superior derecho muestran la intensidad de fluorescencia media en el cuadrante indicado.

10 Figura 23: estrategia de selección para la detección de basófilos. Se seleccionaron células positivas para CD193 con baja SSC como basófilos. Se aplicó una ventana de adquisición de cuadrante cuando la expresión de CD63 de células sin tratar estaba ajustada a 0.

15 Figura 24: expresión de CD63 de basófilos tratados con 8A6_N297A y 8A6_ce2-4-degly en diferentes concentraciones. Para excluir los posibles efectos de activación de 8A6_N297A y 8A6_ce2-4-degly *per se*, las muestras incubadas con 8A6_N297A y 8A6_ce2-4-degly durante la noche se analizaron para determinar su expresión de CD63 sin activación adicional por antígeno.

20 Figura 25: control de LPS para incubación de 8A6_ce2-4-degly. Se incubó sangre completa con 50 UE/ml de LPS durante 24 h y se analizó la expresión de CD63.

Figura 26: activación de controles después de 6 h.

25 Figura 27: activación de muestras tratadas con 8A6-IgG o 8A6-IgE después de 6 h.

Figura 28: activación de controles después de 24 h.

Figura 29: activación de muestras tratadas con 8A6-IgG o 8A6-IgE (8A6-ce2-ce4 desglucosilado) después de 24 h.

30 Figura 30: prueba de activación con polen.

EJEMPLOS - Generación de anticuerpos anti-receptor IIB de Fc gamma

35 Ejemplo 1. PREPARACIÓN DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 8A6

Se produjo el clon de anticuerpo monoclonal 8A6 inmunizando ratas Long-Evans con receptor Fc γ RIIB humano soluble recombinante. Se produjeron líneas celulares de hibridoma de células de bazo de rata y se seleccionaron los anticuerpos que se unen específicamente a Fc γ RIIB humano con mayor afinidad que a Fc γ RIIA. En segundo lugar, se seleccionaron los anticuerpos producidos por los hibridomas mencionados anteriormente para detectar características no bloqueantes, es decir, estos anticuerpos todavía permiten la unión de IgG o IC a Fc γ RIIB unido a la membrana, usando técnicas conocidas en la técnica.

45 Se inyectaron 50 μ g del Fc γ RIIB humano soluble recombinante purificado (sFc γ RIIB, SEQ ID NO. 5) por vía intraperitoneal (i.p.) y por vía subcutánea (s.c.) en ratas LOU/C usando adyuvante incompleto de Freund suplementado con 5 nmol de CpG 2006 (TIB MOLBIOL, Berlín, Alemania). Después de un intervalo de seis semanas, se administró i.p. y s.c. un refuerzo final con 50 μ g de sFc γ RIIB y CpG 2006 tres días antes de la fusión. La fusión de la línea celular de mieloma con las células de bazo inmunitarias de rata se realizó según procedimientos convencionales. Los sobrenadantes de hibridoma se sometieron a prueba en un inmunoensayo en fase sólida con sFc γ RIIB o la proteína irrelevante sFc γ RIIA (SEQ ID NO. 12) recubierta con placas de ELISA. Los AcM del sobrenadante del cultivo de tejidos unidos a las proteínas se detectaron con AcM conjugados con HRP contra los isotipos de IgG de rata (TIB173 anti-IgG2a, TIB174 anti-IgG2b, TIB170 anti-IgG1 todos de ATCC, R-2c anti-IgG2c de elaboración propia), evitando así AcM de clase IgM. El AcM 8A6 (IgG2a de rata) reconoció Fc γ RIIB y no se unió a Fc γ RIIA usando el ensayo ELISA específico de antígeno. Se usó un ensayo basado en FACS para seleccionar los anticuerpos para la unión específica del antígeno nativo. Además, los anticuerpos se seleccionaron para detectar características no bloqueantes, es decir, estos anticuerpos todavía permiten la unión de IgG o complejos inmunitarios a Fc γ RIIB unido a la membrana.

60 Para producir una cantidad suficiente de anticuerpo para la caracterización de los constructos quiméricos y humanizados, las células CHO-S FreeStyle™ se transfectaron transitoriamente. El día antes de la transfección, las células se sembraron a 0,5 x 10⁶ células/ml. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio para obtener una concentración celular final de 20 x 10⁶ células/ml. Para cada transfección, se transfirieron 3 ml de la suspensión celular a una placa de 6 pocillos. El ADN plasmídico para la transfección se aisló usando el kit HiSpeed Plasmid Maxi (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y se eluyó en H₂O libre de endotoxinas. Para cada transfección, se añadieron a la suspensión celular 75 μ g de ADN plasmídico que codifica para la cadena ligera y 75 μ g de ADN plasmídico que codifica para la cadena pesada y se mezclaron suavemente. Posteriormente se añadió PEI (Polyplus) y se mezcló suavemente. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C y el 5% de CO₂ con agitación continua (100

rpm). La suspensión celular se llenó con medio hasta un volumen final de 15 ml para lograr una concentración celular final de 4×10^6 células/ml y se transfirió a un matraz de 125 ml. Las células se incubaron a 37°C y el 5% de CO₂ con agitación continua (100 rpm) y, después de 6 días, se recogió el sobrenadante centrifugándolo 2 veces (4000 rpm, 5 min). El sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,2 µm y se determinó el título de los anticuerpos (véase a continuación).

La determinación del título de anticuerpos se realizó mediante dos métodos de HPLC diferentes, HPLC de fase inversa (RP) y HPLC con proteína A. El análisis mediante RP-HPLC se realizó con un sistema de HPLC Agilent 1200 Series. Los datos se analizaron con el software "Chem Station for LC Systems" Rev. B.04.02. Los componentes del disolvente fueron: isopropanol (calidad para HPLC; Roth), acetonitrilo (calidad para gradiente de HPLC; Roth), H₂O (filtrada 0,2 µm) y tetrafluoroacetato (TFA) (para síntesis de péptidos; Sigma). Disolvente A: H₂O, el 0,1% de TFA; Disolvente B: el 60% de isopropanol, el 30% de acetonitrilo, el 9,9% de H₂O y el 0,1% de TFA. Se usó una columna Phenomenex Jupiter (n.º 525166-6) con una porosidad de 300 Å y material de separación con un diámetro de partícula de 5 µm. El anticuerpo unido se eluyó con un gradiente lineal del 30% al 43% de disolvente B en el plazo de 10 minutos. La detección se produjo a $\lambda = 210$ nm con un detector de UV/Vis.

El análisis mediante HPLC con proteína A se realizó con un sistema de HPLC Agilent 1200 Series. Los datos se analizaron con el software "Chemstation" versión Rev. B.04.02. Se usaron los siguientes disolventes, disolvente A: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0; disolvente B: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0. Para el análisis, se rellenoó una columna de protección analítica Upchurch de 2x 20 mm con 120 µl de medio de cromatografía de perfusión Poros® 20A de Applied Biosystems (Life Technologies). El anticuerpo unido se eluyó con el 100% de disolvente B. En caso de que se recogiera el anticuerpo purificado, las fracciones se neutralizaron con Tris 56 mM, pH 8,0.

Los anticuerpos expresados se purificaron con una columna HiTrap™ rProtein A FF de 1 ml (GE Healthcare) mediante cromatografía de líquidos para la separación rápida de proteínas (Åkta Explorer). El tampón de ejecución contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, el tampón de elución se componía de glicina 100 mM, NaCl 150 mM, pH 2,7. Los anticuerpos eluidos se neutralizaron con Tris-HCl 60 mM, pH 8,0, se concentraron, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a -80°C.

Ejemplo 2. SELECCIÓN DE ANTICUERPOS Y CARACTERIZACIÓN DE 8A6

La selección de los sobrenadantes de hibridoma se realiza usando técnicas tal como se conoce en el estado de la técnica, por ejemplo, ensayo de unión ELISA, ensayo de Biacore o análisis de unión de FACS. Para someter a prueba la unión específica de antígeno del 8A6 quimérico o las variantes humanizadas, las placas de ELISA (Nunc-Immuno Plate, F96 Maxisorp) se recubrieron con 1 µg/ml de sFcγRIIB, sFcγRIIA (SEQ ID NO. 12) o sFcγRIIAmut (SEQ ID NO. 13) en PBS (100 µl/pocillo) durante la noche a 4°C. Después de 3 etapas de lavado en Tween al 0,01% en PBS, se realizó el bloqueo con BSA al 2% en PBS (300 µl/pocillo) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 etapas de lavado, se aplicaron diluciones en serie del sobrenadante o anticuerpo purificado (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos purificados se diluyeron en PBS, BSA al 2%. Los sobrenadantes se suplementaron con PBS 10 veces y BSA al 20% para obtener una concentración final de BSA al 2% en PBS. Como control positivo para FcγRIIA se usó el anticuerpo de cabra anti-FcγRIIA humano (R&D Systems, AF1875). Después de 3 etapas de lavado en Tween al 0,01% en PBS, se incubó el respectivo anticuerpo secundario de burro anti-HRP de cabra (F(ab')₂, Jackson-Immuno-Research) o anticuerpo de cabra anti-HRP humana (F(ab')₂, Dianova) durante 1 hora a temperatura ambiente (100 µl/pocillo). Los pocillos se lavaron 6 veces en Tween al 0,01% en PBS. Se añadió sustrato (OPD que contiene H₂O₂ al 0,03%) (100 µl/pocillo) y la reacción se detuvo con H₂SO₄ 4 M (50 µl/pocillo). Posteriormente se midió la absorbancia en un espectrómetro a 492 nm.

El análisis de la unión específica al antígeno nativo del 8A6 quimérico o las variantes humanizadas se realizó a través de la unión celular en células Raji (ATCC® CCL-86™) y K-562 (ATCC® CCL-243™). Las células se sedimentaron por centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1%, NaN₃ al 0,01%). Después de una etapa de centrifugación adicional, las células se resuspendieron en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2×10^6 células/ml y se dividieron en alícuotas 50 µl de la suspensión celular en una placa de fondo en U de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie de las variantes humanizadas y de ch8A6 en tampón de FACS.

Para verificar la expresión de FcγRIIA en células K-562, se diluyó el anticuerpo de ratón anti-CD32 humano (Stem Cell Technologies Inc., Clon VI.3) en tampón de FACS. Se añadieron 50 µl de los anticuerpos diluidos a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron 2 veces en tampón de FACS. Posteriormente, se diluyeron 50 µl de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con PE (F(ab')₂, Dianova) o anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (F(ab')₂, Dianova) en tampón de FACS, se añadieron a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de 2 etapas de lavado en tampón de FACS, se resuspendieron las células en 300 µl de tampón de FACS y se midieron en BD FACSCanto™ II (software: BD FACSDiva™).

Para determinar si los anticuerpos contra Fc γ R1IB todavía permiten la unión de IgG o complejos inmunitarios a Fc γ R1IB unido a la membrana, se realizó un ensayo basado en FACS. Las células se sedimentaron por centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1%, NaN₃ al 0,01%). Después de una etapa de centrifugación adicional, las células se resuspendieron en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2x10⁶ células/ml. Se prepararon diluciones en serie de los anticuerpos (ch8A6_N297A, chGB3_N297A, R&D Ab mab1875) en tampón de FACS. Se mezclaron 25 μ l de los anticuerpos diluidos en una placa con fondo en U de 96 pocillos con 25 μ l de Beriglobina agregada marcada con Alexa488 (2,5 μ l/pocillo). La IgG humana agregada se aisló por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex-200 (16/60) a partir de un producto de IgG agrupado disponible comercialmente (Beriglobina).

Se añadieron 50 μ l de la suspensión celular a la mezcla de anticuerpo-Beriglobina y se incubó durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron 2 veces en tampón de FACS. Posteriormente, se diluyeron 50 μ l de anticuerpo secundario de cabra anti-IgG humana conjugado con PE (F(ab')₂, Dianova) o anticuerpo secundario anti-PE de rata en tampón de FACS, se añadieron a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Después de 2 etapas de lavado en tampón de FACS, las células se resuspendieron en 300 μ l de tampón de FACS y se midieron en BD FACSCanto™ II (software: BD FACSDiva™) (figura 3).

Ensayo de unión de FACS

El análisis de la unión específica al antígeno nativo del 8A6 quimérico o las variantes humanizadas se realizó a través de la unión celular en células Raji y K-562. Las células se sedimentaron por centrifugación (400 g, 5 min) y se lavaron en tampón de FACS (solución salina equilibrada de Hanks, FCS al 1%, NaN₃ al 0,01%). Después de una etapa de centrifugación adicional, las células se resuspendieron en tampón de FACS para obtener una concentración celular final de 2x10⁶ células/ml y se dividieron en alícuotas 50 μ l de la suspensión celular en una placa con fondo en U de 96 pocillos. Se prepararon diluciones en serie de las variantes humanizadas y de ch8A6 en tampón de FACS. Las células Raji y K562 se incubaron con concentraciones crecientes de anticuerpos humanizados y el anticuerpo quimérico como control. Las células Raji se usaron para someter a prueba la unión en Fc γ R1IB (figura 4), las células K562 para analizar la unión inespecífica a Fc γ R1IA (figura 5). Los anticuerpos unidos a células se detectaron con anticuerpo secundario conjugado con PE. Todas las variantes humanizadas se unen a Fc γ R1IB con una afinidad comparable a ch8A6_N297A y todas las variantes humanizadas todavía se unen a Fc γ R1IB con mayor avidez que Fc γ R1IA.

La unión de anticuerpos a sFc γ R1IB y sFc γ R1IA se analizó mediante resonancia de plasmón superficial usando un biosensor Biacore T200 (GE Healthcare/Biacore). Los experimentos se realizaron en LMU, Departamento de Biología y Microbiología, Unidad de Servicio Bioanalítico. Los anticuerpos analizados se capturaron en un chip sensor CM5 de serie S usando el kit de captura de anticuerpos humanos según el protocolo del fabricante. Las variantes de hu8A6 o ch8A6 se capturaron a una concentración de 10 nM durante 1 minuto. El analito de sFc γ R1IB se inyectó en diversas concentraciones durante 3 minutos. Las mediciones se realizaron a 25°C y flujo continuo (10 μ l/min). Los datos se evaluaron usando el software de evaluación Biacore T200 (versión 1.0) suponiendo la unión 1:1.

Ejemplo 3. QUIMERIZACIÓN DEL ANTICUERPO 8A6 DE RATA

Se construyó el anticuerpo monoclonal quimérico anti-Fc γ R1IB 8A6 fusionando la región VH de 8A6 de rata con un péptido señal y una región constante de IgG1 humana. Además, se generó una variante desglucosilada de la cadena pesada usando un dominio constante de IgG1 que contenía una mutación N297A. Para construir el gen de cadena ligera de 8A6, la región VL de 8A6 de rata se fusionó asimismo con una secuencia señal y la secuencia para una región constante kappa humana se siguió por subclonación en un vector de expresión de mamífero.

ENSAYOS *IN VITRO*

Células, reactivos y anticuerpos

Las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano Daudi y Ramos se adquirieron de DSMZ (ACC 78 y ACC 603) y se mantuvieron en RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen) suplementado con FBS al 10% (Gibco/Invitrogen), MEM NEAA (Gibco/Invitrogen), piruvato de sodio 1 mM (Gibco/Invitrogen) y L-glutamina 2 mM (Gibco/Invitrogen) a 37°C y el 5% de CO₂. Las células B humanas primarias se purificaron de sangre heparinizada de donantes sanos usando gradientes de densidad Ficoll (Leucosep, Greiner Bio-One, Biocoll Separating Solution, Biochrom) y aislamiento magnético negativo (Dynabeads Untouched Human B Cells, Invitrogen). La pureza de las células B enriquecidas se estudió mediante análisis de FACS mediante tinción con anticuerpo anti-hCD19-APC (BD Pharmingen n.º 555415), anticuerpo anti-hCD3-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences n.º 332771) y anticuerpo anti-hCD56-PE (BD Pharmingen n.º 555515). Las células B primarias se usaron directamente para los experimentos sin cultivo adicional. Anticuerpo anti-Fc γ R1IB 2B6 bloqueante según el documento EP1534335.

Protocolo de estimulación usando una mezcla de estimulación de anticuerpos solubles

Para la estimulación simultánea de BCR y Fc γ R1IB, se estableció un sistema de anticuerpos usando una mezcla de

anticuerpos de anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM 2 µg/ml (Southern Biotech n.º 9022-01, clon UHB) y anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG(1,2a,3) 20 µg/ml (Epitomics n.º 3020-1, clon M111-2) de los cuales la parte Fc reacciona de manera cruzada con el receptor FcγRIIB humano. Los controles se realizaron con 20 µg/ml de anticuerpo policlonal de conejo anti-hlgM (anticuerpos en línea n.º ABIN117299) o una mezcla que contenía anticuerpo anti-hlgM y control de isotipo mlgG2b, 2 µg/ml (clon MPC-11, BD Pharmingen n.º 557351). Se recogieron 3x10⁵ células de las líneas celulares de linfoma Daudi o Ramos y las células B primarias se recogieron por centrifugación y se incubaron con las diferentes mezclas de estimulación en medio de ensayo (RPMI 1640 + FBS al 1%) durante 20 minutos a 37°C.

Posteriormente, se añadieron a las muestras 5 µg/ml de anticuerpos anti-FcγRIIB ch8A6 (0,8 µl de una dilución 1:10), 2B6 (1,5 µl de una dilución 1:10) o chGB3_N297A (1,1 µl de una dilución 1:10) y las células se incubaron adicionalmente durante 25-30 min. La lisis se realizó tal como se describe por separado.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western de patrones de fosforilación

Lisis celular

Las células se sedimentaron a 4°C, se lavaron con PBS helado y se incubaron en 10 µl de tampón de lisis (tampón RIPA (señalización celular) suplementado con inhibidores de fosfatasa (PhosStop, Roche), inhibidores de proteasa (Complete Ultra Mini, sin EDTA, Roche) y PMSF 1 mM (Fluka Biochemica)) durante 30-45 min en hielo.

SDS-PAGE

Después de la centrifugación, los sobrenadantes se cargaron con tampón de muestra (tampón de muestra LDS de NuPAGE, agente reductor de muestra de NuPAGE, Invitrogen) aplicado a SDS-PAGE (minigeles de Novex Bis-Tris de NuPAGE, tampón de ejecución MES para SDS (Invitrogen)). Para SDS-PAGE, se añadieron tampón de muestra LDS y agente reductor y se calentaron las muestras a 95°C durante 5 min. Las muestras se almacenaron a -20°C o se analizaron directamente mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia de tipo Western.

Transferencia de proteínas a membranas de PVDF y detección

Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Roti-PVDF, Roth, tampón de transferencia Tris 10 mM, glicina 100 mM, metanol al 10%, condiciones de transferencia: 240 mA const., 90 min a 4°C). Las membranas se bloquearon con BSA al 5% en TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,1%) y se tiñeron con anticuerpo anti-FcγRIIB/fosfo-CD32 (pY292) (Cell Epitomics n.º 2308-1, 1:50000, 4°C durante la noche) o anticuerpo anti-fosfo-SHIP (1:1000, Cell Signaling n.º 3941) y anticuerpo anti-HRP de conejo (Jackson ImmunoResearch n.º 111-036-045, 1:50.000 en TBS-T, 1 h TA). Se detectó quimioluminiscencia (desarrollada con Western Lightning Plus, Perkin Elmer) en películas de rayos X.

Separación

Para análisis posteriores con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas fosforiladas, se separaron las membranas (Re-Blot Plus, Millipore) durante 10 minutos, se lavaron y se bloquearon antes de tefñirlas con anticuerpo anti-β-actina (Sigma-Aldrich n.º A1978, 1:50.000 y anticuerpo anti-HRP-IgG de ratón, Sigma-Aldrich n.º A9044) o anticuerpos para otras proteínas de señalización.

La fosforilación de ITIM de FcγRIIB en PBMC de un donante sano aumentó notablemente por los anticuerpos divulgados

Se aislaron PBMC de un donante sano y se dejaron sin tratar o se incubaron durante 25 minutos con la mezcla de estimulación (anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM y anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG). Posteriormente, las células se trataron con ch8A6 o con tampón como control. Los lisados celulares se sometieron a análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos de detección apropiados tal como se señaló anteriormente. Se detectó un aumento notable en la fosforilación del motivo ITIM de FcγRIIB de las células (PBMC, células B) (figura 6a). Los experimentos de control con estimulación de células con mezcla de estimulación sola, o sólo anticuerpo monoclonal de ratón anti-hlgM, anticuerpo monoclonal de conejo anti-mlgG en combinación con ch8A6 no mostraron un aumento de la fosforilación de ITIM de FcγRIIB (figura 6b). Por tanto, los anticuerpos divulgados muestran un efecto notable sobre la fosforilación de ITIM de células humanas con BCR (receptor de células B) reticulado y FcγRIIB unido a la membrana (expresado endógenamente) y no en células sin estimular, es decir, células sin BCR reticulado ni FcγRIIB unido a la membrana. Durante una enfermedad autoinmunitaria, el BCR y el FcγRIIB unido a la membrana se reticularán mediante autoantígenos o complejos inmunitarios (IC). Los anticuerpos pueden inhibir las células B autorreactivas patógenas en una enfermedad autoinmunitaria aumentando la fosforilación de ITIM de FcγRIIB. Sin embargo, los anticuerpos también son capaces de aumentar la fosforilación de ITIM sin BCR reticulado (figura 6c).

Comparación de los efectos de ch8A6 con el anticuerpo chGB3_N297A

Comparación del efecto del clon ch8A6_N297A y el clon chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM. Las células Daudi humanas se trataron con una mezcla de anticuerpos y, posteriormente, ch8A6_N297A, chGB3_N297A o 2B6 tal como se describió anteriormente. El anticuerpo chGB3_N297A, como ch8A6_N297A, es un anticuerpo anti-Fc γ RIIB no bloqueante y reconoce un epítipo similar. La adición de ch8A6_N297A a las células tratadas con la mezcla de anticuerpos ya mostró un aumento de la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB a concentraciones de 0,05 μ g/ml. Aunque las concentraciones crecientes del chGB3_N297A mostraron una estimulación dependiente de la dosis de la fosforilación del motivo inhibitor, sorprendentemente este clon de anticuerpo no pudo alcanzar niveles de fosforilación comparables a 8A6. La cuantificación densitométrica de la película de rayos X con el software "ImageJ" calculó valores de un máximo de 2,8 veces las señales fosfo, mientras que hu8A6_N297A condujo a un aumento de 9,8 veces en comparación con las células sin tratar (figura 7). Por tanto, los anticuerpos de la invención muestran de manera clara y sorprendente un aumento de la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB en comparación con el anticuerpo chGB3_N297A.

Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6, quimérica 8A6_N297A y chGB3_N297A sobre la fosforilación de ITIM en PBMC primarias

Los anticuerpos chGB3_N297A, ch8A6_N297A y 8A6 humanizado se compararon en cuanto a su influencia sobre la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB de PBMC humanas primarias. Después de la reticulación de BCR y Fc γ RIIB por la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 μ g/ml y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de ITIM. De nuevo, los anticuerpos tienen sorprendentemente un efecto notablemente aumentado sobre la fosforilación de ITIM de Fc γ RIIB en comparación con el anticuerpo en el estado de la técnica (figura 8).

Coinmunoprecipitación del motivo ITIM de Fc γ RIIB fosforilado y SHIP-1

Después de la reticulación de los receptores, la fosfatasa SHIP se recluta en la membrana mediante la unión de su dominio SH2 a la fosfo-tirosina en el motivo ITIM de Fc γ RIIB, seguido por la fosforilación de tirosina en el motivo NPXY en el dominio C-terminal de SHIP-1. La relocalización en la membrana y la posterior fosforilación del motivo NPXY es esencial para la función reguladora de SHIP-1. Su efecto sobre el flujo de calcio, la supervivencia celular, el crecimiento, la detención del ciclo celular y la apoptosis está mediado a través de las rutas de PI3K y Akt. Tyr1021 se ubica en uno de los motivos de NPXY en SHIP-1, y su fosforilación es importante para la función de SHIP-1 (Nimmerjahn, Ravetch, 2008).

Se estimularon células Daudi humanas con la mezcla de anticuerpos tal como se define en la sección [00103] anterior y, después de la lisis en un tampón de lisis suave (tampón de lisis ColP), las muestras se incubaron con 2B6 para capturar Fc γ RIIB. Los complejos se unieron a perlas ferromagnéticas acopladas a proteína G y se aislaron con una rejilla magnética.

Se prepararon lisados de 1×10^7 células/muestra en 500 μ l de tampón de lisis ColP, incubando las células durante 30 minutos en hielo y agitando con vórtex cada 10 minutos. Los restos celulares se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Se incubaron 500 μ l de los lisados con 10 μ g de 2B6 durante 2-3 h a 4°C de extremo a extremo. Las perlas magnéticas acopladas a proteína G se lavaron dos veces con 500 μ l de tampón de lisis y se añadieron 50 μ l de perlas (1,5 mg) a los complejos de lisado-anticuerpo durante la noche a 4°C (rueda giratoria). Los complejos se eluyeron de las perlas lavando dos veces con 200 μ l de tampón de lisis y calentando las perlas durante 5 minutos en 25 μ l de tampón de muestra 1x LDS que contenía agente reductor. Después de la centrifugación a 4000 x g durante 30 segundos, se aplicaron 10 μ l del sobrenadante a SDS-PAGE para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western.

Los análisis de inmunotransferencia de tipo Western de los lisados muestran niveles significativamente elevados de fosfo-SHIP-1 en las muestras de células tratadas con la mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A. Como la precipitación se realizó con el anticuerpo 2B6 específico de Fc γ RIIB, sólo se coprecipitó SHIP-1 aislada que se había unido a Fc γ RIIB. Las membranas después de la separación y la retención mostraron una fosforilación potenciada del motivo ITIM de Fc γ RIIB en muestras tratadas con ch8A6_N297A, lo que se correlaciona con las señales de fosfo-SHIP-1. Una segunda retención con α -hFc γ RIIB a, b, c (Ac Fc γ RII/CD32 humano, policlonal, IgG de cabra, R&D Systems, AF1330) mostró cantidades iguales del receptor Fc γ RIIB precipitado en todas las muestras, sirviendo como control de carga para SDS-PAGE (figura 9).

Ejemplo 4. HUMANIZACIÓN DE ch8A6 en formato IgG

Se humanizó ch8A6 injertando las secuencias de la región determinante de complementariedad del anticuerpo de rata en regiones de entramado humanas. Para seleccionar regiones de entramado humanas, las secuencias de V_H y V_L se compararon con las de los segmentos de la línea germinal de la región de unión y variable de Ig humana, obtenidas de bases de datos disponibles públicamente (IMGT; V-BASE). Se escogieron las secuencias de línea germinal humana

VH_3_30 más IGHJ4 y las secuencias de línea germinal humana VK3_15 más IGKJ2 para las cadenas pesada y ligera, respectivamente. Se generaron varias variantes para las cadenas pesadas y ligeras humanizadas. Los genes que codifican para las secuencias designadas de la V_H y V_L humanizadas seguido de subclonación en un vector de expresión de mamífero. El procedimiento de selección de las variantes de anticuerpos se realizó directamente a partir del sobrenadante de células CHO-S transfectadas (Invitrogen). El anticuerpo 8A6 quimérico sirvió como control de transfección y patrón durante la selección de las variantes humanizadas. Se analizaron las variantes de hu8A6 para detectar la unión en sFc γ RIIB y sFc γ RIIA mediante ELISA y en Fc γ RIIB nativo mediante FACS en células Raji (véase lo anterior). Además, se realizó una caracterización cinética de las variantes de anticuerpos con resonancia de plasmón superficial.

Prueba de variantes de 8A6 humanizadas

Para someter a prueba las actividades de fosforilación de las variantes de humanización de 8A6, las células Daudi se estimularon con la mezcla de anticuerpos, se trataron con 0,5 ó 5 μ g/ml de las diferentes variantes de 8A6 y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de ITIM.

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A

Todas las variantes humanizadas de 8A6 sometidas a prueba fueron capaces de inducir la fosforilación del receptor y los niveles de fosforilación fueron comparables a los inducidos por ch8A6_N297A del mismo lote de purificación. Por tanto, no se detectó pérdida de actividad después de la segunda ronda de humanización. Aunque los datos de Biacore sugirieron diferentes afinidades para las diferentes combinaciones de cadena pesada y ligera, esas diferencias no fueron detectables mediante análisis de inmunotransferencia de tipo Western (figura 10).

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A, anticuerpo anti-Fc γ RIIB (2B6) bloqueante y chGB3_N297A

Después de que se escogiera la combinación final de cadenas humanizadas, se comparó la variante, que combina la cadena pesada V_H10 con cadena ligera V_L6, con los anticuerpos ch8A6_N297A, 2B6 y chGB3_N297A (figura 11).

ENSAYOS *IN VIVO*

Modelo de PBL de LES

Se irradiaron ratones Rag2/gamma-c/Fc γ -/- a una dosis de 6 Gy y se inyectaron por vía intraperitoneal con cantidades variables de leucocitos de sangre periférica humana en 500 μ l de PBS.

El tratamiento de los ratones se inició 2 semanas después de la inyección de células después de que se haya verificado el injerto de PBL de pacientes humanos con LES mediante la presencia de hIgM o hIgG. Los ratones se trataron con 200 μ l de tampón (PBS) o 20 μ g de anticuerpo (ch8A6_N297A) en 200 μ l de PBS por vía intraperitoneal dos veces por semana durante 4 semanas. Los ratones se pesaron y se desangraron para obtener suero una vez por semana. Las muestras de suero se congelaron a -80°C hasta su uso posterior (figura 12).

ELISA

Las muestras de suero se analizaron mediante ELISA para detectar la presencia de IgG, IgM e IgM e IgG anti-ADN humanas totales.

Para la cuantificación de IgM e IgG séricas totales en muestras de suero, se usaron el kit de cuantificación ELISA de IgM humana de Bethyl y el kit de cuantificación ELISA de IgG humana (Biomol) según las instrucciones del fabricante. La DO se midió con el lector de microplacas sintonizable VersaMax (Molecular Devices) a 450 y 650 nm.

Para la detección de anticuerpos anti-ADN, las placas de ELISA se recubrieron con 10 μ g/ml de BSA metilada (Sigma) en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se recubrieron con 50 μ g/ml de ADN de timo de ternera (Sigma) en PBS a 4°C durante la noche. El bloqueo de la unión inespecífica se realizó con PBS/gelatina al 0,1%/BSA al 3%/EDTA 1 mM durante 2 h a temperatura ambiente. Los sueros se diluyeron 1:100 en la disolución de bloqueo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Como anticuerpo de detección, se usó el anticuerpo conjugado con HRP del kit de cuantificación de IgM humana (Bethyl) y se diluyó 1:10.000 en disolución de bloqueo seguido de incubación durante 1 h a temperatura ambiente. Se usó PBS para todas las etapas de lavado. Para la detección, se añadió disolución de TMB y la reacción se detuvo con ácido ortofosfórico al 6%.

Modelo PBL de LES, inmunoglobulina sérica humana total

Los niveles totales de IgG humana [μ g/ml] se analizaron en ratones injertados con PBL de donantes humanos que padecían LES. No se detectaron diferencias significativas en la IgG humana total entre PBS o anticuerpo anti-Fc γ RIIB.

El anticuerpo según la invención no influye significativamente en la IgG humana total (figura 13).

Modelo de PBL de LES, influencia en anticuerpos anti-ADN (IgG específica de la enfermedad)

- 5 Se observó una reducción marcada en la IgG anti-ADN humana específica de la enfermedad en ratones anti-Fc γ RIIB a partir de la semana 4 después de la transferencia/injerto de PBL de LES. Los anticuerpos divulgados reducen específicamente la cantidad de anticuerpos anti-ADN relevantes para la enfermedad (figura 14).

10 EJEMPLO 5 - Generación de anticuerpos biespecíficos que se unen al receptor IIB de Fc gamma y al receptor de Fc epsilon

Definición de la nomenclatura de 8A6-IgG y el constructo 8A6-IgE:

quimérico

8A6-IgG	ch8A6_N297A
8A6_c ϵ 2-4	ch8A6_c ϵ 2-4
8A6_c ϵ 2-4 desglucosilado	ch8A6_c ϵ 2-4-degly
8A6_c ϵ 3-4	ch8A6_c ϵ 3-4
8A6_c ϵ 3-4 desglucosilado	ch8A6_c ϵ 3-4-degly
8A6_c ϵ 2-4 desglucosilado producido en Trenzyme	ch8A6_c ϵ 2-4-degly_T
8A6_c ϵ 3-4-desglucosilado producido en Trenzyme	ch8A6_c ϵ 3-4-degly_T

15 humanizado:

8A6_cs2-4	hu8A6_c ϵ 2-4
8A6_c ϵ 2-4 desglucosilado	hu8A6_c ϵ 2-4-degly
8A6_c ϵ 3-4	hu8A6_c ϵ 3-4
8A6_c ϵ 3-4 desglucosilado	hu8A6_c ϵ 3-4-degly

Descripción de la generación, expresión y purificación de diferentes anticuerpos IgE contra Fc γ RIIB.

Diseño de los constructos

- 20 Tal como se muestra en la figura 15, todos los constructos tienen en común que el dominio Fab del anticuerpo híbrido es equivalente a una molécula de IgG (dominio variable y dominio CL/CH1). Además, todos los constructos tienen el dominio constante C ϵ 3 y C ϵ 4 de IgE. Estos dominios son homólogos con Cg2 y Cg3 de IgG. En un anticuerpo IgG, la región de bisagra es responsable de la flexibilidad requerida de la molécula y de la formación del dímero a través de puentes disulfuro. Esta región de bisagra no existe en el anticuerpo IgE. En lugar de la región de bisagra, el dominio adicional C ϵ 2 adopta esta función. El anticuerpo 8A6-IgE muestra una alta flexibilidad del dominio Fab junto con un cambio óptimo del dominio Cg1 al dominio C ϵ . Por tanto, se diseñaron variantes que contenían o bien la región de bisagra de IgG (véase la figura 15) o bien el dominio Fc ϵ completo (C ϵ 2, C ϵ 3, C ϵ 4) de IgE (véase la figura 15). Otra variación se refiere a la cantidad diferente de sitios de N-glicosilación en el dominio Fc ϵ . La glicosilación del dominio IgE-Fc no tiene influencia sobre la afinidad por Fc ϵ RI, sino sobre la expresión y la estabilidad del anticuerpo. Estos constructos se clonaron en vectores plasmídicos siguiendo procedimientos de laboratorio convencionales.

Líneas celulares y condiciones de cultivo.

- 35 Las células CHO-S se cultivaron según las recomendaciones del proveedor. Brevemente, las células se cultivaron en medio CHO-S Freestyle, suplementado con Glutamax 2 mM y se pasaron cada 2-3 días. Las células se cultivaron a 37°C, el 5% de CO $_2$, 100 rpm. Un día antes de la transfección, las células se dividieron en densidad 0,5 x 10 6 /ml y se verificó la viabilidad (> 96%).
- 40 Las líneas celulares de linfoma de Burkitt humano Raji y Daudi se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con FBS al 10%, MEM NEAA, piruvato de sodio 1 mM y L-glutamina 2 mM a 37°C y el 5% de CO $_2$. Las células se pasaron cada 2-3 días en una densidad de 0,2-1.0 x 10 6 células/ml.

Transfección de CHO-S con constructos de Fc γ RIIB IgE

- 45 El día de la transfección, la densidad celular fue de 1,0 – 2,0 x 10 6 /ml. Se diluyeron 8,0 x 10 8 células en 20 ml de medio CHO Freestyle (40 x 10 6 /ml). Se añadieron 1000 μ g de ADN de plásmido (500 μ g de cada uno, cadena pesada y ligera) (50 μ g de ADN/ml de volumen de transfección), seguido de la adición de 2000 μ g de PEI (00 μ g de PEI/ml de volumen de transfección). Las células se incubaron durante 3 h a 37°C, el 5% de CO $_2$, 100 rpm. Después de esto, la

suspensión celular se diluyó 1:10 en medio CHO Freestyle, se añadió ácido valproico 0,5 mM, y se incubó a 31°C, el 5% de CO₂, 100 rpm durante 10 días. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación 2 x 10 min a 4000 x g.

Determinación del título, purificación y cromatografía de exclusión molecular.

5

Determinación del título de anticuerpos mediante HPLC con proteína A

El análisis de HPLC con proteína A se realizó con un sistema de HPLC Agilent 1200 Series. Los datos se analizaron con el software "Chemstation" versión Rev. B.04.02. Se usaron los siguientes disolventes, disolvente A: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 8,0; disolvente B: Tris/HCl 0,05 M, glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,0. Para el análisis, se rellenó una columna de protección analítica Upchurch de 2x 20 mm (n.º C-130B) con 120 µl de medios de cromatografía de perfusión Poros® 20A de Applied Biosystems (Life Technologies, n.º 4374732). El anticuerpo unido se eluyó con el 100% de disolvente B. En caso de que se recogiera el anticuerpo purificado, las fracciones se neutralizaron con Tris 56 mM, pH 8,0.

15

Purificación de 8A6-IgE

Después de seis días de cultivo, las células se recogieron y los sobrenadantes que contenían anticuerpos se captaron por centrifugación, 2 x 10 min a 4000 x g. Los anticuerpos se purificaron con una columna High trap Protein A FF de 5 ml (GE Healthcare) mediante cromatografía de líquidos para la separación rápida de proteínas (Åkta Explorer). La unión del anticuerpo a la proteína A está mediada a través de su región de entramado VH3. El tampón de ejecución contenía Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, el tampón de elución se componía de glicina 100 mM, pH 2,7, NaCl 150 mM. Los anticuerpos eluidos se neutralizaron con Tris-HCl 60 mM, pH 8,0, se concentraron (Sartorius Vivaspin4) hasta aprox. 1,0 mg/ml, estéril, se esterilizaron por filtración con un filtro de 0,2 µm y se almacenaron a -80°C.

25

Ejemplo 6: Caracterización de constructos quiméricos de 8A6-IgE

HPLC de exclusión molecular

Para determinar el estado oligomérico y la homogeneidad de las variantes de 8A6-IgE purificadas, se aplicaron muestras a SE-HPLC. Se realizó SE-HPLC con un sistema de HPLC Agilent 1200 Series. Los datos se analizaron con el software "Chemstation" versión Rev. B.04.02. El análisis se realizó con una columna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare). Se usó el siguiente disolvente, His 5 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5. Se aplicaron 25 µg de proteína en una concentración de 0,5 µg/µl.

35

Esto reveló que las variantes de 8A6-IgE glicosiladas pueden tener la tendencia a formar más dímeros en comparación con el ch8A6_N297A convencional, mientras que 8A6-IgE desglucosilada parece estar más degradada y tiene un mayor porcentaje de fragmentos en comparación con ch8A6_N297A convencional.

Ensayos de unión

Se realizaron varios ensayos de unión para analizar la afinidad de unión y la especificidad de los anticuerpos. Para estos ensayos de unión, se generó FcεRIα soluble según el siguiente protocolo:

Generación de FcεRIα soluble

Transfección de CHO-S con sFcεRIα

El día de la transfección, la densidad celular fue de ~1,0 x 10⁶/ml. Se transfirieron 500 ml de la suspensión celular a dos matraces de 1 litro. El reactivo Freestyle Max se invirtió suavemente y se diluyeron 312,5 µl en 5 ml de Optipro SFM (TA). Se diluyeron 312,5 µg de ADN plasmídico (pAC91, sFcεRIα-H6) (SEQ ID NO: 37) en 5 ml de Optipro SFM y se mezclaron suavemente. El reactivo diluido FreestyleMax se añadió a la mezcla de ADN/Optipro SFM y se incubó durante 15 minutos a TA. La mezcla de ADN y lípidos se añadió lentamente a las células mientras se agitaba lentamente el matraz. Las células transfectadas se incubaron a 37°C, el 5% de CO₂, 100 rpm durante 6 días. Los sobrenadantes se recogieron por centrifugación 2 x 10 min a 4000 x g.

55

Purificación de sFcεRIα

Para la producción de FcεRIα soluble recombinante, las células CHO-S se transfectaron con el dominio extracelular marcado con His de FcεRIα humano (pAC91), tal como se describe. La purificación de sFcεRIα del sobrenadante celular se realizó mediante purificación con Ni-NTA (Qiagen, n.º 1018244) con un Åkta Explorer. Se usaron los siguientes tampones: tampón de unión que contiene NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0; tampón de elución que contiene NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 400 mM, pH 8,0. El sFcεRIα unido se eluyó con un gradiente lineal del 0% al 100% de B. Después de la concentración de las fracciones de sFcεRIα, se realizó el intercambio de tampón con His 10 mM, pH 6,5. Esto se siguió de purificación de sFcεRIα con cromatografía de

65

intercambio aniónico débil con DEAE Sepharose FF (GE Healthcare, n.º 17-0709-10) con un Äkta Explorer. El disolvente A se componía de His 10 mM, pH 6,5; el disolvente B contenía His 10 mM, NaCl 0,5 mM, pH 6,5. El sFc ϵ R1 α unido se eluyó con un gradiente lineal del 2% al 100% de B. La proteína concentrada se almacenó en His 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5, -80°C.

5

SDS-PAGE

Para el análisis de SDS-PAGE, se aplicó 1 μ g de anticuerpo purificado o material Trenzyme a un gel Bis-Tris de NuPAGE (4-12%). Los anticuerpos se aplicaron o bien en tampón de muestra LDS de NuPAGE o bien en condiciones reductoras además de reactivo reductor de muestra y precalentamiento hasta 75°C durante 10 minutos, según las recomendaciones del fabricante. Se realizó SDS-PAGE con una potencia constante de 200 V durante 30 minutos. Después de eso, los geles se lavaron dos veces en H₂O y se tiñeron con disolución de tinción Simply Blue (Life Technologies). La retirada de colorante en exceso se produjo en H₂O y la visualización de geles se realizó usando un aparato Transilluminator (UV, luz blanca).

10

15

Ensayo de unión ELISA

Unión de 8A6-IgE a sFc γ RIIB o sFc ϵ R1 α

20

25

30

Para someter a prueba la eficacia de unión de los anticuerpos 8A6_c ϵ 2-4/8A6_c ϵ 3-4 en formato glicosilado y no glicosilado tanto para sFc γ RIIB como para sFc ϵ R1 α , se estableció un ensayo ELISA. Para esto, las placas de 96 pocillos se recubrieron con SM101 o sFc ϵ R1 α , 1 μ g/ml en PBS (volumen 100 μ l), durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron 2x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01%, y se bloquearon en PBS, BSA al 2%, 250 μ l/pocillo durante 2 h, TA. Después de una etapa de lavado, las muestras de anticuerpos se añadieron en series de dilución apropiadas en PBS, BSA al 2% a los pocillos recubiertos durante 1 h a TA. Las placas se lavaron 3x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01% y el anticuerpo de detección secundario dirigido contra la cadena ligera kappa humana conjugada con HRP se añadió 1:8000 en PBS, BSA al 2%, durante 1 h a TA. Después de tres etapas de lavado, el anticuerpo conjugado con HRP unido se detectó con OPD, H₂O₂ al 0,03%, 100 μ l/pocillo. La reacción se detuvo con 50 μ l de H₂SO₄ 4 M y se midió la absorción a 492 nm con un lector de ELISA (Tecan, Spectra FluorPlus). La unión directa a sFc γ RIIB reveló que los cuatro constructos de 8A6_IgE tienen la misma afinidad por sFc γ RIIB que el anticuerpo ch8A6_N297A (figura 16) debido al dominio Fab compartido. Sin embargo, la unión de los constructos de 8A6-IgE a sFc ϵ R1 α demostró diferencias entre los constructos con la parte Fc de IgE de longitud completa (c ϵ 2-4) y las versiones más cortas (c ϵ 3-4) (figura 17).

35

Unión de 8A6-IgE a sFc γ RIIB y sFc ϵ R1 α - ELISA en sándwich

Se realizó un ELISA en sándwich que mostraba unión a ambos antígenos al mismo tiempo. La eficacia de unión de las variantes 8A6_c ϵ 2-4/8A6_c ϵ 3-4 generadas hacia ambas dianas sFc γ RIIB así como sFc ϵ R1 α se sometió a prueba en este ensayo ELISA en sándwich. Para esto, las placas de 96 pocillos se recubrieron con un Fc γ RIIB soluble (SM101), 1 μ g/ml en PBS (volumen 100 μ l), durante 1 h a TA. Las placas se lavaron 2x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01%, y se bloquearon en PBS, BSA al 2%, 250 μ l/pocillo durante 2 h, TA. Después de una etapa de lavado, las muestras de anticuerpos se añadieron en series de dilución apropiadas en PBS, BSA al 2% a los pocillos recubiertos durante 1 h a TA. Las placas se lavaron 3x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01% y se incubaron con sFc ϵ R1 α , 0,005 μ g/ml en PBS, BSA al 2% durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01% y se añadió anticuerpo de detección biotinilado secundario CRA1 dirigido contra Fc ϵ R1 α humano, 0,5 μ g/ml diluido en PBS, BSA al 2% durante 1 h a TA. Las placas se lavaron 3x en PBS, Tween $\text{\textcircled{R}}$ -20 al 0,01% y se añadió estreptavidina conjugada con HRP 1:200 en PBS durante 20 min a TA. Después de tres etapas de lavado, la estreptavidina conjugada con HRP unida se detectó con OPD, H₂O₂ al 0,03%, 100 μ l/pocillo. La reacción se detuvo con 50 μ l de H₂SO₄ 4 M y se midió la absorción a 492 nm con un lector de ELISA.

50

El ELISA en sándwich confirmó los resultados del ELISA. De nuevo, se mostró la baja afinidad de los constructos 8A6_c ϵ 3-4 hacia Fc ϵ R1 α con unión simultánea a Fc γ RIIB con el fragmento Fab del anticuerpo.

Análisis de unión de FACS

55

La unión de anticuerpos a la superficie celular expresada en Fc γ RIIB nativo se determinó mediante análisis de FACS. Se usaron células Raji, ya que esta línea celular de linfocitos B derivada del linfoma de Burkitt expresa altos niveles de Fc γ RIIB. Se sedimentaron las células Raji y se sembraron 1,0 x 10⁵ células/pocillo en placas de cultivo celular de fondo redondo de 96 pocillos en 50 μ l de tampón de FACS (HBSS, FBS al 5%, NaN₃ al 0,01%). Los anticuerpos que van a someterse a prueba se aplicaron a las células Raji en una serie de dilución apropiada en 50 μ l de tampón de FACS y se incubaron durante 1 h a 4°C. Después de dos etapas de lavado con 200 μ l de tampón de FACS, las células se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con FITC dirigido contra la cadena ligera kappa humana (Fab)₂, diluido 1:200 en tampón de FACS durante 30 min a 4°C. Después de dos etapas de lavado, los sedimentos celulares se resuspendieron en 150 μ l de tampón de FACS y se analizaron por citometría de flujo con un FACS Canto II (BD Biosciences).

60

El ensayo mostró para todas las variantes de 8A6 que permanece la capacidad de unión de los fragmentos Fab a Fc γ RIIB en comparación con ch8A6_N297A, independientemente de los cambios introducidos en la parte Fc del anticuerpo (Figura 18).

Biacore

La afinidad de los constructos de anticuerpos hacia Fc γ RIIB y Fc ϵ RI α se analizó adicionalmente mediante resonancia de plasmón superficial (SPR) usando el sistema Biacore™ T200.

El sFc γ RIIB se inmovilizó de manera covalente en un chip sensor CM5 de la serie S (Biacore, BR-1005-30) usando el protocolo de acoplamiento de aminas convencional (BIAsensor surface Handbook, Biacore). Las variantes de anticuerpos se capturaron a una concentración de 50 nM durante 1 min. El analito de sFc ϵ RI α se inyectó en diversas concentraciones 0,1-25 nM durante 3 min, seguido de una etapa de disociación durante 7 min. El chip CM5 se regeneró con un tampón que contenía MgCl₂ 3 M disolviendo la interacción del ligando y SM101, preparándolo para un nuevo ciclo de análisis. Las mediciones se realizaron a 25°C y flujo continuo (10 μ l/min). La evaluación de los datos se realizó usando el software de evaluación Biacore T200 (versión 1.0), suponiendo la unión 1:1.

Resumen de los experimentos de unión:

Se descubrió que la afinidad de unión de todos los constructos a Fc γ RIIB era igual a la del anticuerpo IgG original. Con respecto a la unión a Fc ϵ RI α , los resultados de la caracterización de unión a ambos antígenos de 8A6-IgE sugieren que las variantes acortadas 8A6_c ϵ 3-4/degly pueden no ejercer la misma alta afinidad hacia Fc ϵ RI que los constructos de IgE de longitud completa.

Ejemplo 7: Producción y caracterización de anticuerpos 8A6-IgE humanizados.

Humanización de 8A6-IgE

Para la humanización de ch8A6-IgE, la cadena pesada variable del anticuerpo se intercambió con la cadena pesada variable 10 (VH10) humanizada de SEQ ID NO. 3. La cadena ligera variable 6 (VL6; SEQ NO.4) se usó junto con las cadenas pesadas humanizadas para la expresión de los constructos de 8A6-IgE humanizados.

El intercambio de la cadena pesada variable se realizó mediante un procedimiento de clonación convencional. El intercambio de la cadena pesada variable se produjo mediante un procedimiento de clonación convencional. La correcta inserción de los insertos se verificó mediante secuenciación de ADN.

Además, se eliminó la lisina C-terminal de la secuencia de la cadena pesada y se intercambió en un codón de terminación (AAA \rightarrow TAA). Esto reduce significativamente la cantidad de variantes de carga. Se logró mediante mutagénesis por PCR y la mutación exitosa se verificó mediante secuenciación.

Caracterización de la unión al antígeno de 8A6-IgE humanizadas mediante ELISA

Se realizó ELISA usando el mismo protocolo que en el ejemplo 2. La unión de las variantes de hu8A6-IgE se sometió a prueba en comparación con ch8A6_N297A. En este caso, no se detectaron diferencias en la afinidad de unión hacia Fc γ RIIB soluble (figura 19). Se sometió a prueba la unión de variantes de 8A6-IgE humanizadas y quiméricas a sFc ϵ RI α con su parte Fc. Ambas variantes de 8A6-IgE con la parte Fc acortada (c ϵ 3-4) quimérica y humanizada mostraron una menor afinidad hacia Fc ϵ RI α en comparación con las variantes de 8A6-IgE con la parte Fc completa (c ϵ 2-4). Sin embargo, no se detectaron diferencias en los anticuerpos quiméricos y humanizados. (figura 20).

Ejemplo 8: Marcaje de 8A6-IgE y cinética de unión en monocitos de sangre periférica (PBMC)

Los estudios de unión para Fc ϵ RI se realizaron con el constructo de longitud completa ch8A6_c ϵ 2-4 en su versión desglucosilada.

Métodos:

Se marcaron 8A6 (IgE) e (IgG) con el colorante fluorescente NHS-Fluo488.

Se desalaron 500 μ g de cada anticuerpo en PBS a través de una columna PD-10 según las instrucciones del fabricante. La absorbancia de las fracciones de elución se midió con un fotómetro a 280 nm (referencia: 320 nm) y se agruparon las fracciones que contenían la mayor cantidad de anticuerpos. Después de la concentración a través de columnas Vivaspin4, pudieron recuperarse aproximadamente 400 μ g de los anticuerpos.

El colorante fluorescente Fluo488 se reconstituyó en DMSO y su concentración se calculó midiendo la fluorescencia

a su máximo de emisión a 517 nm.

El anticuerpo y el colorante se mezclaron en una razón molar de 1:10, añadiéndose lentamente el colorante a la disolución de anticuerpo agitando con vórtex la muestra. Los cálculos exactos para la cantidad de anticuerpo y colorante pueden encontrarse en el anexo. La disolución se incubó durante 1 h a 25°C con agitación constante a 300 rpm (Eppendorf Thermomixer). Las moléculas de colorante libres se separaron mediante purificación a través de una columna PD-10. Se agruparon las fracciones con las cantidades de proteína marcada más altas, medidas a 280 nm (anticuerpo) y 510 nm (colorante), se concentraron nuevamente a través de columnas Vivaspin4 y se calculó la concentración final y el grado de marcaje (D.O.L.).

Se calcularon los anticuerpos marcados finales:

ch8A6_cε2-4-degly-T: 1,35 µg/µl, D.O.L.: 2,2

ch8A6_cε3-4-degly-T: 1 µg/µl, D.O.L.: 2,86

Cálculo de las cantidades de colorante fluorescente y anticuerpo:

• Peso molecular de 8A6 (IgE): aprox. 176.000 Da = 176.000 g/mol

→ 350 µg de anticuerpo = 2 nmol

• Peso molecular de Fluo488: aprox. 981 mol/l

→ Resuspensión de una cantidad indefinida en DMSO

→ Dilución 1:5.000 en agua y medición de DO₅₁₇ (máximo de emisión del colorante)

→ Concentración [µg/µl] = factor de dilución x DO₅₁₇ x 918/80.000 = 8,6 nmol/µl

• Cálculo de la razón de colorante con respecto a anticuerpo:

→ razón molar deseada de colorante:anticuerpo = 10:1

→ anticuerpo 2 nmol → colorante 20 nmol

→ 2,3 µl de colorante

Cálculo del grado de etiquetado (D.O.L.):

• Definiciones para el cálculo de la concentración de proteínas y D.O.L

→ A_{máx} = absorbancia al máximo de emisión del colorante, 517 nm para Fluo488

→ A₂₈₀ = absorbancia a 280 nm (proteína)

→ CF = factor de corrección; definido por Interchim específicamente para cada colorante unido a proteína; A₂₈₀ (colorante libre)/A_{máx} (colorante libre)

→ PM: peso molecular de la proteína

→ ε: coeficiente de extinción

• c[proteína] = 1,4 x (A₂₈₀ - A_{máx} x CF)

• D.O.L. = (A_{máx} x PM)/(c[proteína] x ε_{colorante})

Preparación de PBMC por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll

Las capas leucocitarias de donantes sanos se diluyeron 1:1 con HBSS y se depositaron 30 ml sobre 15 ml de disolución de separación Biocoll en un tubo Falcon de 50 ml. Después de la centrifugación a 1000xg durante 20 minutos sin pausa, la fracción de leucocitos se recogió con una pipeta de plástico. Las células se lavaron dos veces con medio de crecimiento completo y se contaron en una cámara de recuento de Neubauer.

Cinética de unión de ch8A6 cε2-4-degly-T y ch8A6 N297A en PBMC

Se incubaron $0,5 \times 10^6$ PBMC en 100 μ l de medio de crecimiento completo en una placa de 96 pocillos (fondo plano) en la incubadora a 37°C con las siguientes diluciones de anticuerpos: ch8A6_cε2-4-degly-T cFluo488 2 μ g/ml, ch8A6_N297A-Fluo488 2 μ g/ml, 8A6 cε2-4-degly-T 2 μ g/ml. Se preparó un pocillo adicional para cada punto de tiempo. Como control, la unión a FcγRIIB en PBMC se bloqueó incubando previamente ch8A6_cε2-4-degly-T-Fluo488 con un exceso molar de 5 veces de SM101 durante 30 min a TA. El bloqueo del sitio de unión a FcγRIIB se sometió a prueba mediante análisis de FACS después de la incubación en células Raji.

Después de 10, 30, 60, 120 y 240 min, así como después de una incubación durante la noche, las células se centrifugaron a 400xg durante 5 min y se resuspendieron en 100 μ l de tampón de FACS que contenía 2,5 μ l de α -hCD19-PeCy7, 5 μ l de α -hCD63-PerCP y 2,5 μ l de α -hCD193-APC en una placa de fondo redondo de 96 pocillos durante 30 min en hielo. Después de dos etapas de lavado con tampón de FACS, las muestras se analizaron con un FACS Canto II.

Unión de 8A6-IgG y 8A6-IgE marcadas con Fluo488 a las células Raji

Las células Raji se incubaron con diferentes concentraciones del anticuerpo marcado y se representaron los valores medios de fluorescencia frente a las concentraciones de anticuerpo. El anticuerpo 8A6_cε2-4-degly mostró una alta afinidad de unión a su receptor FcγRIIB en la superficie de células Raji (véase la figura 21). La especificidad de esta unión se confirmó mediante el análisis de células CHO, incubadas con el mismo constructo, donde no se detectaron señales de superficie para el anticuerpo marcado tal como se esperaba debido a que las células CHO carecen del receptor FcεRI. Estos datos confirmaron que la unión del anticuerpo no se alteró durante todo el procedimiento de marcaje o mediante el fluorocromo NHS-Fluo488 unido.

Control de enmascaramiento de SM101 del sitio de unión a FcγRIIB de 8A6 cε2-4-degly

Para permitir la detección de la unión de la parte Fc de 8A6-IgE a las células, el dominio F(ab)₂, el sitio de unión a FcγRIIB, respectivamente, se bloqueó mediante la incubación previa del anticuerpo con SM101. La capacidad de unión de los constructos se analizó con FACS. El análisis de FACS mostró claramente un bloqueo de 8A6_cε2-4-degly a su receptor, FcγRIIB, después de la incubación previa con un exceso molar de 5 veces del receptor soluble (SM101). El valor medio de fluorescencia después de la incubación previa con SM101 se redujo al 11,8%, en comparación con el anticuerpo sin tratar. Por tanto, el anticuerpo 8A6_cε2-4-degly enmascarado podía usarse como control para la incubación de PBMC.

Cinética de unión en PBMC

La unión del anticuerpo 8A6-IgE, marcado con Fluo488, en PBMC aisladas se evaluó mediante análisis de FACS. Por tanto, las células se tiñeron con α -hCD193-APC y α -hCD19-PeCy7 para distinguir las células B (CD19) y los basófilos (CD193, baja SSC). CD63 se tiñó para analizar la activación de los basófilos.

La expresión de CD63 en los basófilos no cambió durante la medición (no se muestra).

La figura 22 muestra las señales de fluorescencia en las células B, detectadas por un anticuerpo α -hCD19-PeCy7. Los números verdes reflejan los valores medios de fluorescencia medidos de las células positivas para CD19 para los anticuerpos marcados con Fluo488.

Ejemplo 9: prueba de activación de basófilos (BAT)

El ensayo se basa en el método descrito por primera vez por Sainte-Laudy *et al.* 1994 (Sainte-Laudy, J, *et al.*, Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. Allerg. Immunol. (Paris) 26, 211-4) y 1996 (Sabbah, A y Sainte-Laudy, J., Flow Cytometry applied to the analysis of Lymphocyte and Basophil activation. ACI International 8, 116-9) donde la activación de basófilos por alérgenos o controles se detecta mediante citometría de flujo midiendo el aumento de CD63 (gp53) en la superficie celular. Se añaden alérgenos y controles positivos a sangre completa heparinizada y se mide la expresión superficial de CD63 mediante una tinción de anticuerpo específica que contiene anti-hCD193 para identificar basófilos y anti-hCD63 para medir la activación. La liberación de histamina puede medirse en paralelo como un segundo parámetro para la activación y desgranulación de basófilos.

Mediante la reticulación de FcγRIIB y FcεRI con 8A6-IgE en la superficie de los basófilos, la respuesta celular a un alérgeno a través del FcεRI se regula por disminución.

Se obtuvieron 50 μ l de sangre completa heparinizada de donantes con una alergia al polen conocida (u otra alergia definida con alérgeno disponible para la prueba).

En estos experimentos, se usó el anticuerpo ch8A6_ε2-4-degly en comparación con el anticuerpo ch8A6_N297A quimérico 8A6 (IgG), mutante N297A

5 Para controles positivos y negativos, un tiempo de incubación de 15 min con alérgenos o controles fue suficiente para la activación apropiada de los basófilos, tal como se describe en el manual del kit.

10 Se incubaron 50 µl de sangre completa heparinizada con 50 µl de estímulo (alérgeno, fMLP o anticuerpo de control anti-FcεRI) y 100 µl de tampón de estimulación. Se disolvieron α-FcεRI y fMLP tal como se describe en el manual del kit y se usaron sin diluir. Los alérgenos se diluyeron 1:5 en tampón de estimulación. El tampón y el estímulo se prepararon en tubos Falcon y se añadieron 50 µl de muestra de sangre directamente a esta disolución sin entrar en contacto con las paredes del tubo. Se añadieron 20 µl de reactivo de tinción o anticuerpos disponibles comercialmente (α-hCD63-PE y α-hCD193-Alexa647), disueltos en el tampón de estimulación. Las muestras se agitaron suavemente con vórtex y se incubaron en un baño de agua, precalentado hasta 37°C, durante 15 minutos. Para la lisis, se aplicaron 2 ml de reactivo de lisis a cada tubo, luego se agitaron con vórtex las muestras y se incubaron a TA durante 10 min en la oscuridad. Después de la centrifugación a 500xg durante 5 minutos, se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos en 300 µl de tampón de lavado del kit. El análisis de FACS se realizó en un FACS Canto II usando los siguientes parámetros:

FSC	lineal	voltaje: 269
SSC	lineal	voltaje: 401
FITC	log	voltaje: 447
PE	log	voltaje: 379

20 Un anticuerpo α-FcεRI y el péptido fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina, SEQ ID NO: 38) estaban contenidos en el kit y se usaron a 50 µl por muestra.

Estrategia de selección

25 La figura 23 muestra la estrategia de selección en sangre completa lisada. Los parámetros FSC y SSC se establecieron como lineales. Se observaron tres poblaciones: linfocitos, monocitos y granulocitos. Los basófilos pueden detectarse al mismo nivel de SSC que los linfocitos. La representación gráfica de la expresión de CD193 frente a SSC conduce a la detección de dos poblaciones distintas que expresan CD193. La población con una baja SSC se identificó como granulocitos basófilos. Se aplicó una ventana de adquisición de cuadrante en un gráfico que muestra la expresión de CD193 (eje Y) frente a CD63 (eje X), de modo que la fluorescencia de CD63 en muestras sin tratar era casi cero.

Usando una estrategia selección posterior (*backgating*), las poblaciones celulares se caracterizaron adicionalmente.

35 Las ventanas de adquisición que incluían la población de baja expresión de CD63 y la población de alta expresión de CD63 se superpusieron con el diagrama FSC-SSC del lisado de sangre total no seleccionado. Se encontró que la población de baja expresión se asentó cerca de la población de linfocitos, lo que confirma que esta población seleccionada son basófilos. Por el contrario, la población de alta expresión se encontró en el límite derecho del eje de SSC, lo que refleja que esas células son altamente granulares y que son granulocitos eosinófilos.

Expresión de CD63 de controles positivos y negativos

45 La expresión de CD63 de las células sin tratar se estableció en el 0% o sólo muy pocas células positivas en el cuadrante inferior de la ventana de adquisición de cuadrante que se había establecido en los basófilos. El anticuerpo α-FcεRI activó de manera reproducible los basófilos a niveles del 90% de células positivas para CD63, mientras que el péptido fMLP sólo indujo una expresión moderada de CD63 con un 25-30% de células positivas.

50 Para determinar si los anticuerpos que deben someterse a prueba para determinar su capacidad para reducir una respuesta alérgica podrían activar los basófilos *per se*, se administraron ch8A6_N297A y ch8A6_ε2-4-degly en dos concentraciones diferentes sin una activación adicional de las células.

La figura 24 muestra los datos obtenidos para estas muestras.

55 La incubación de muestras de sangre completa con 0,5 ó 2 µg/ml de 8A6-IgG o 8A6-IgE no activó los basófilos *per se* tal como se muestra en la figura superior. La expresión superficial de CD63 no cambió y se detectaron menos del 1% de células positivas en dos experimentos independientes.

En una siguiente etapa del análisis, se estudió el efecto de las contaminaciones por endotoxinas sobre la activación de basófilos. Como el 8A6_ε2-4-degly contiene ~30 UE/ml de endotoxina del procedimiento de producción, se realizó un control de LPS para excluir los efectos derivados del material contaminado. Por tanto, se incubó una muestra de

sangre por separado con 50 UE/ml de LPS (diluido 1:4 en el ensayo) en paralelo a 8A6_cε2-4-degly solo. Tal como se muestra en la figura 25, el tratamiento de basófilos con LPS en concentraciones tal como se esperaba en la producción contaminada no condujo a la activación inespecífica de las células. Por tanto, los efectos medidos después del tratamiento con 8A6_cε2-4-degly pueden correlacionarse directamente con la actividad del anticuerpo.

5

Tratamiento preventivo de basófilos con 8A6 cε2-4-degly

Se incubaron muestras de sangre completa con controles, 8A6_N297A y 8A6_cε2-4-degly en concentraciones variables. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo y se midió el potencial de los basófilos para activarse mediante polen.

10

A) Punto de tiempo 0 h

Justo después de la adición de los anticuerpos respectivos a alícuotas de sangre completa, se tomaron las primeras muestras para el punto de tiempo 0 y se analizó su potencial para activarse mediante estimulación con polen. Este punto de tiempo se midió en dos experimentos independientes. No se observó ningún efecto de 8A6_N297A o 8A6_cε2-4-degly en este punto de tiempo, lo que representa aproximadamente 5 min de incubación con los anticuerpos (tiempo desde el pipeteo hasta la incubación de la muestra). Los basófilos en todas las muestras pudieron activarse mediante polen hasta aproximadamente el 90% de las células que expresan CD63.

15

B) Punto de tiempo 2 h

Después de 2 h de incubación, se detectó la activación de basófilos sin pérdida de actividad como se observa por la activación de α -FcεRI (92% de células positivas) y las células sin tratar con estimulación con polen (93,4%). La incubación con 8A6_N297A en concentraciones que oscilan desde 0,5 hasta 5 μ g/ml no influyó en la activación de basófilos por polen (valores entre el 91 y el 91,6% de células positivas). En este punto de tiempo, la activación de basófilos parecía estar reducida en muestras que se habían tratado con 8A6_cε2-4-degly (del 84,4 al 88%), aunque no se detectó una dependencia de la dosis.

20

C) Punto de tiempo 6 h

Después de 6 h de incubación, el potencial de las células para activarse mediante controles positivos disminuyó hasta alrededor del 85% para la activación con polen y el 87% para el tratamiento con α -FcεRI (figura 26) Mientras que el tratamiento con 8A6-IgG mostró resultados comparables a los controles positivos (el 85-88%), las células incubadas con 8A6-IgE mostraron un potencial de activación disminuido (el 76-84%) (figura 27). Después de la incubación con 8A6_cε2-4-degly 0,5 μ g/ml, sólo el 76,6% de los basófilos pudieron activarse mediante polen. Sin embargo, no se detectó dependencia de la dosis y una dosis más alta mostró una expresión de CD63 ligeramente elevada en comparación con el tratamiento con 0,5 μ g/ml.

25

D) Punto de tiempo 24 h

El último punto de tiempo, medido en dos experimentos independientes, mostró una reducción en la activación para el tratamiento con α -FcεRI hasta el 75% de expresión de CD63 (figura 28 y figura 29).

30

Ejemplo 10: Prueba de activación con polen

Se incubó durante la noche sangre completa heparinizada de un donante sano que dio positivo para una atopia de polen con 5 μ g/ml de 8A6_cε2-4 desglucosilado o 8A6_cε3-4 desglucosilado (SM301 cε2-4 o cε3-4), respectivamente. Para el análisis, se mezclaron 50 μ l de muestra de sangre con 50 μ l de polen (diluido previamente 1:5 en tampón de estimulación), 100 μ l de tampón de estimulación (kit FlowCast) y 20 μ l de disolución de tinción (3 μ l de a-hCD193-Alexa647, 3 μ l de a-hCD63-PerCP, 3 μ l de a-hCD203c-PE, 11 μ l de tampón de estimulación). Las muestras se mezclaron suavemente en un mezclador de vórtex y se incubaron en un baño de agua, precalentado hasta 37°C, durante 15 min. Para la lisis, se aplicaron 2 ml de reactivo PharmLyse (BD Biosciences) a cada tubo, se mezclaron de nuevo las muestras y se incubaron a TA durante 10 min en la oscuridad. Después de la centrifugación a 500xg durante 5 min, se retiraron los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos en 300 μ l de tampón de FACS. Se estableció una ventana de adquisición en células con alta SSC, positivas para CD193 pero negativas para CD203c, que constituyen eosinófilos.

35

40

A menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de componentes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Tal como se usa en el presente documento, los términos "aproximadamente" y "alrededor de" significan dentro del 10 al 15%, preferiblemente dentro del 5 al 10%. Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la memoria descriptiva son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que pretenden obtenerse mediante la presente invención. Como mínimo, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la

45

50

55

60

65

luz del número de cifras significativas notificadas y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la divulgación son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se notifican con la mayor precisión posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente determinados errores que resultan necesariamente de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba.

Los términos “un”, “una”, “el/la” y referentes similares usados en el contexto de la descripción de la invención deben interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. La recitación de intervalos de valores en el presente documento sólo pretende servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor distinto que se encuentre dentro del intervalo.

Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionado en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otra manera. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la invención divulgada en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Cada miembro del grupo puede referirse o reivindicarse individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos encontrados en el presente documento. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Determinadas realizaciones de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones en estas realizaciones descritas serán evidentes para los expertos en la técnica tras leer la descripción anterior. El inventor espera que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores tienen la intención de que la invención se practique de otra manera que la específicamente descrita en el presente documento. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está incluida en la divulgación, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

Las realizaciones específicas divulgadas en el presente documento pueden estar limitadas adicionalmente en las reivindicaciones usando el lenguaje que consiste en o que consiste esencialmente en. Cuando se usa en las reivindicaciones, ya sea como presentado o añadido por enmienda, el término de transición “que consiste en” excluye cualquier elemento, etapa o componente no especificado en las reivindicaciones. El término de transición “que consiste esencialmente en” limita el alcance de una reivindicación a las etapas o los materiales especificados y aquellos que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s).

Además, se han hecho numerosas referencias a patentes y publicaciones impresas a lo largo de esta memoria descriptiva.

Para terminar, debe entenderse que las realizaciones de la invención divulgada en el presente documento son ilustrativas de los principios de la presente invención. Por tanto, a modo de ejemplo, pero no de limitación, pueden utilizarse configuraciones alternativas de la presente invención según las enseñanzas en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención no se limita a eso precisamente tal como se muestra y describe. La presente invención está definida por las reivindicaciones.

Lista de secuencias

<110> SuppreMol GmbH

<120> Nuevos anticuerpos dirigidos contra el receptor IIB de Fc gamma y el receptor de Fc epsilon

<130> SUP15095PCTEP

<150> Documento EP14002825.9

<151> 13-08-2014

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<221> MISC_FEATURE

5 <222> (1)..(113)

<223> VH de r8A6

<400> 1

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Lys Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Pro Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

10

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

15

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> VL de r8A6

20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(108)

<223> VL de r8A6

25

<400> 2

ES 2 802 176 T3

Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Thr Ser Met Phe Ile Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Met Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr
 20 25 30

Val Asp Trp Phe Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Thr Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Asn Met Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Tyr His Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Thr Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 3
 <211> 113
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo humanizado

10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(113)
 <223> VH de hu8A6

15 <400> 3
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Pro Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

20 <210> 4

ES 2 802 176 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> anticuerpo humanizado

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (1)..(108)
 <223> VL de hu8A6

<400> 4
 Gln Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Tyr Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Asn His Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

15
 <210> 5
 <211> 181
 <212> PRT
 20 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(181)
 25 <223> Fc γ RIIB humano

<400> 5

ES 2 802 176 T3

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

Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg
 20 25 30

Gly Thr His Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly
 35 40 45

Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn
 50 55 60

Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu
 65 70 75 80

Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln
 85 90 95

Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys
 100 105 110

His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn
 115 120 125

Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro
 130 135 140

Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile
 145 150 155 160

Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala
 165 170 175

Pro Ser Ser Ser Pro
 180

- <210> 6
- 5 <211> 329
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> anticuerpo humanizado
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(329)
- 15 <223> CH de hu8A6_wt
- <400> 6

ES 2 802 176 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

ES 2 802 176 T3

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
 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
 325

<210> 7
 <211> 106
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo humanizado

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(106)
 <223> CL de hu8A6_wt

15 <400> 7
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

ES 2 802 176 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 8
 <211> 339
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> anticuerpo humanizado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(339)
 <223> VH de hu8A6

15 <400> 8
 caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactattaca tggcctgggt cgcaggct 120
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcatcc atatcatagc atggaagcaa taagtactac 180
 ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaccggga 300
 gactactggg gccaaagAAC cctggtcacc gtcagctca 339

20 <210> 9
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 25 <223> anticuerpo humanizado

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(324)
 30 <223> VL de hu8A6

400> 9

ES 2 802 176 T3

cagatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gtcctgtggt tcctatgtcg actggtacca gcagaaacct 120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca ggtacactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtctgcag tataacaacc atccttacac ttttggccag 300
gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

<210> 10
<211> 990
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> anticuerpo humanizado

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(990)
15 <223>CH de hu8A6_wt

<400> 10
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaaactcag gcgcoctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggttgagccc 300
aaatcttctg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgggggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggt gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aacctctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactcag acggtcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggttaa 990

<210> 11
20 <211> 321
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
25 <223> anticuerpo humanizado

<220>

<221> misc_feature
 <222> (1)..(321)
 <223> CL de hu8A6_wt

5 <400> 11
 acggtggctg caccatcggc cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 12
 <211> 125
 10 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (1)..(125)
 <223> FC γ RIIA soluble humano

<400> 12
 Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr
 1 5 10 15
 Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu
 20 25 30
 Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr
 35 40 45
 Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val
 50 55 60
 Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Gln Lys Phe Ser Arg Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His
 85 90 95
 Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr
 100 105 110

20 Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Met Gly Ser Ser Ser Pro
 115 120 125

<210> 13
 <211> 179
 <212> PRT
 25 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(179)
 30 <223> FC γ RIIA humano mutado soluble

<400> 13

ES 2 802 176 T3

Met Ala Pro Pro Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Pro Trp Ile Asn
 1 5 10 15

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

Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro
 35 40 45

Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asp Ser
 50 55 60

Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val
 65 70 75 80

His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu
 85 90 95

Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser Trp Lys
 100 105 110

Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys
 115 120 125

Lys Phe Ser Arg Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His
 130 135 140

Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu
 145 150 155 160

Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser Met Gly
 165 170 175

Ser Ser Pro

- 5 <210> 14
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> artificial
- 10 <220>
- <223> CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
- <400> 14
- Asp Tyr Tyr Met Ala
- 1 5
- 15 <210> 15
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> artificial
- 20 <220>
- <223> CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
- <400> 15

ES 2 802 176 T3

Ser Ile Ser Ser Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

- 5 <210> 16
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial
- 10 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 de rata
 <400> 16
 Ala Arg Pro Gly Asp Tyr
 1 5
- 15 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial
- 20 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
 <400> 17
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Tyr Val Asp
 1 5 10
- 25 <210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
- 30 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
 <400> 18
 Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5
- 35 <210> 19
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
- 40 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 de rata
 <400> 19
 Leu Gln Tyr Asn Tyr His Pro Tyr Thr
 1 5
- 45 <210> 20
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> artificial
- 50 <220>
 <223> CDR1 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 humanizado
 <400> 20
 Asp Tyr Tyr Met Ala
 1 5
- 55 <210> 21

ES 2 802 176 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

5 <220>
 <223> CDR2 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 21
 Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

10 Gly

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

15 <220>
 <223> CDR3 de cadena pesada del anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 22
 Ala Arg Pro Gly Asp Tyr
 1 5

20 <210> 23
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> artificial

25 <220>
 <223> CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 humanizado

30 <400> 23
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Val Asp
 1 5 10

35 <210> 24
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial

40 <220>
 <223> CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 24
 Gly Ala Ser Thr Arg Tyr Thr
 1 5

45 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

50 <220>
 <223> CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 8A6 humanizado

<400> 25
 Leu Gln Tyr Asn Asn His Pro Tyr Thr
 1 5

55 <210> 26
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> artificial

ES 2 802 176 T3

<220>

<223> región variable de cadena pesada del anticuerpo GB3

<400> 26

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

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

Ile Tyr Trp Val Lys Gln Trp Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

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

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ile Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

5 Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100

<210> 27

<211> 104

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> región variable de cadena ligera del anticuerpo GB3

15 <400> 27

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Ala Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ala Asn Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100

<210> 28

20 <211> 329

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 802 176 T3

<220>

<223> región constante de cadena pesada de IgG con cambio de N por A en la posición 297 en lo que respecta a pos. 1 como pos. 118

5

<400> 28

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

ES 2 802 176 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Ala 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
 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
325

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> CDR1 de la región variable de cadena pesada

10 <220>

<221> misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15 <220>

<221> misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <220>

<221> misc

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <220>

<221> misc

<222> (3)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <400> 29
Xaa Xaa Xaa Met Ala
1 5

 10 <210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> artificial

 15 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena pesada

 <220>
 <221> misc
 20 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 25 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 30 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 35 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede K o T

 <220>
 <221> misc
 40 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 45 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 50 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 55 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <220>
 <221> misc
 60 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

 <400> 30

<220>
 <221> misc
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 5

<220>
 <221> misc
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 10

<220>
 <221> misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 15

<220>
 <221> misc
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser S o T
 20

<220>
 <221> misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 25

<400> 32
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Val Asp
1 5 10

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> artificial
 30

<220>
 <223> CDR2 de la región variable de cadena ligera
 35

<220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 40

<220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
 45

<220>
 <221> misc
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser T o N
 50

<400> 33
Gly Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Thr
1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 55

<220>
 <223> CDR3 de la región variable de cadena ligera
 60

<220>
 <221> misc

<222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

5 <220>
 <221> misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

10 <220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

15 <220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <220>
 <221> misc
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

25 <220>
 <221> misc
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

30 <220>
 <221> misc
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

35 <220>
 <221> misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <220>
 <221> misc
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

45 <400> 34
Xaa Xaa Xaa Xaa Asn His Xaa Xaa Xaa
 1 5

50 <210> 35
 <211> 433
 <212> PRT
 <213> artificial

55 <220>
 <223> región constante de IgE humana
 <400> 35

ES 2 802 176 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

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr Phe Ser Val Ser Ser Arg
 100 105 110

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

ES 2 802 176 T3

Gly Gly His Phe Pro Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly
 130 135 140

Tyr Thr Pro Gly Thr Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val
 145 150 155 160

Met Asp Val Asp Leu Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu
 165 170 175

Ala Ser Thr Gln Ser Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser
 180 185 190

Asp Arg Thr Tyr Thr Cys Gln Val Thr Tyr Gln Gly His Thr Phe Glu
 195 200 205

Asp Ser Thr Lys Lys Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala
 210 215 220

Tyr Leu Ser Arg Pro Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro
 225 230 235 240

Thr Ile Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val
 245 250 255

Asn Leu Thr Trp Ser Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr
 260 265 270

Arg Lys Glu Glu Lys Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr
 275 280 285

Leu Pro Val Gly Thr Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys
 290 295 300

Arg Val Thr His Pro His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr
 305 310 315 320

Lys Thr Ser Gly Pro Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr
 325 330 335

Pro Glu Trp Pro Gly Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile
 340 345 350

Gln Asn Phe Met Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu
 355 360 365

Val Gln Leu Pro Asp Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr
 370 375 380

ES 2 802 176 T3

Lys Gly Ser Gly Phe Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala
385 390 395 400

Glu Trp Glu Gln Lys Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala
405 410 415

Ala Ser Pro Ser Gln Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly
420 425 430

Lys

<210> 36
<211> 332
<212> PRT
<213> artificial

5

<220>
<223> dominios constantes 3 y 4 de IgE

10

<400> 36
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

Arg 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 Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro
115 120 125

Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu
130 135 140

ES 2 802 176 T3

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

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

Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr
180 185 190

Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro
195 200 205

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
210 215 220

Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
225 230 235 240

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro
245 250 255

Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp
260 265 270

Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
275 280 285

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys
290 295 300

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln
305 310 315 320

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
325 330

<210> 37
<211> 600
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
10 <223> Secuencia de ADN plasmídico de RI de Fc épsilon soluble

<400> 37
atgggtgaca atgacatcca ctttgccttt ctctccacag gtgtccagtc cgtccctcag 60
aacctaagg tctccttgaa ccctccatgg aatagaatat ttaaaggaga gaatgtgact 120
cttacatgta atgggaacaa tttctttgaa gtcagttcca ccaaattggtt ccacaatggc 180
agcctttcag aagagacaaa ttcaagtttg aatattgtga atgccaaatt tgaagacagt 240

ES 2 802 176 T3

ggagaataca aatgtcagca ccaacaagtt aatgagagtg aacctgtgta cctggaagtc 300
ttcagtgact ggctgctcct tcaggcctct gctgaggtgg tgatggaggg ccagcccctc 360
ttcctcaggt gccatggttg gaggaactgg gatgtgtaca aggtgatcta ttataaggat 420
ggtgaagctc tcaagtactg gtatgagaac cacaacatct ccattacaaa tgccacagtt 480
gaagacagtg gaacctacta ctgtacgggc aaagtgtggc agctggacta tgagtctgag 540
cccctcaaca ttactgtaat aaaagctccg cgtgagaagc accatcacca ccatcactga 600

<210> 38

<211> 3

5 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> péptido fMLF

10

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> FORMILACIÓN

15

<400> 38

Met Leu Phe

1

REIVINDICACIONES

1. Molécula de reconocimiento, que es un anticuerpo, que se une con un primer dominio de unión a un receptor de Fc ϵ (Fc ϵ R) y con un segundo dominio de unión a un receptor IIB de Fc gamma (Fc γ RIIB),
 5 en la que el primer dominio de unión comprende al menos una porción de una región constante de IgE,
 en la que el segundo dominio comprende al menos una porción de un dominio Fab,
 10 que comprende en su segundo dominio de unión las siguientes secuencias de CDR en su región variable de cadena pesada y ligera:
 (a) SEQ ID NO. 14 (CDR-H1), SEQ ID NO. 15 (CDR-H2) y SEQ ID NO. 16 (CDR-H3) en su región variable de cadena pesada, y SEQ ID NO. 17 (CDR-L1), SEQ ID NO. 18 (CDR-L2) y SEQ ID NO. 19 (CDR-L3) en su
 15 región variable de cadena ligera; o
 (b) SEQ ID NO. 20 (CDR-H1), SEQ ID NO. 21 (CDR-H2) y SEQ ID NO. 22 (CDR-H3) en su región variable de cadena pesada, y SEQ ID NO. 23 (CDR-L1), SEQ ID NO. 24 (CDR-L2) y SEQ ID NO. 25 (CDR-L3) en su
 20 región variable de cadena ligera.
2. Molécula de reconocimiento según la reivindicación 1, en la que el segundo dominio de unión tiene en su región variable de cadena pesada la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 1 ó 3 y/o en su región variable de cadena ligera la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 2 ó 4.
- 25 3. Molécula de reconocimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la región constante de IgE tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 35, 36, o una porción de la misma.
4. Molécula de reconocimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el anticuerpo está glicosilado o desglucosilado.
 30
5. Secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de reconocimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. Vector que comprende al menos una de las secuencias de ácido nucleico según la reivindicación 5, insertada en dicho vector.
 35
7. Célula huésped transfectada con una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 5, o vector según la reivindicación 6.
- 40 8. Composición farmacéutica que comprende como principio activo una molécula de reconocimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, un ácido nucleico según la reivindicación 5, un vector según la reivindicación 6 o una célula huésped según la reivindicación 7.
- 45 9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en un método para el tratamiento o la profilaxis de alergias.

Análisis de SPR de variantes humanizadas de 8A6 WT y N297A, GB3 WT y ch8A6 WT

	k_{off} [s^{-1}]
hu8A6_wt	9.5×10^{-4}
hu8A6_N297A	8.8×10^{-4}
ch8A6_wt	4.9×10^{-4}
chGB3_N297A	1×10^{-2}

Figura 1

Figura 1: análisis de resonancia de plasmón superficial de 8A6 humanizado (hu8A6_VH10+VL6) según SEQ ID NO. 3 y 4 en formato o bien de tipo natural o bien N297A, ch8A6_WT (según SEQ. ID. NO. 1 y 2) y chGB3_N297A.

Figura 2

Secuencia de hu8A6_wt y hu8A6_N297A

Los aminoácidos de las regiones variables se enumeran simplemente de manera independiente de cualquier sistema de numeración. Para una mejor comprensión de los cambios de aminoácidos en el dominio Fc, se eligió la numeración EU.

Cadena pesada / 8A6_wt humanizado (glicosilado)

Dominio VH (variante VH10)

```
1  QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYMAWVRQA PGKGLEWVAS ISYDGSNKYY
61 GDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARPG DYWGQGLT VSS (SEQ ID
NO. 3)
```

Dominio Fc (N297 glicosilada / alotipo G1m17 que contiene K214; E356; M358; A431 / sin Lys C-terminal; según la numeración EU)

```
118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
298 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 6)
```

Cadena pesada / 8A6_N297A humanizado (desglicosilado)

Dominio VH, véase anteriormente

Dominio Fc (variante N297A / alotipo G1m17 que contiene K214; E356; M358; A431 / sin Lys C-terminal; según la numeración EU)

```
118 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
178 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG
238 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYA
298 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE
358 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
418 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG- (SEQ ID NO. 28)
```

Figura 2: secuencias de las variantes hu8A6_wt y hu8A6_N297A que muestran la posición de la modificación de aminoácidos de N por A en formato N297A

Análisis de FACS que muestra las características no bloqueantes de ch8A6_N297A

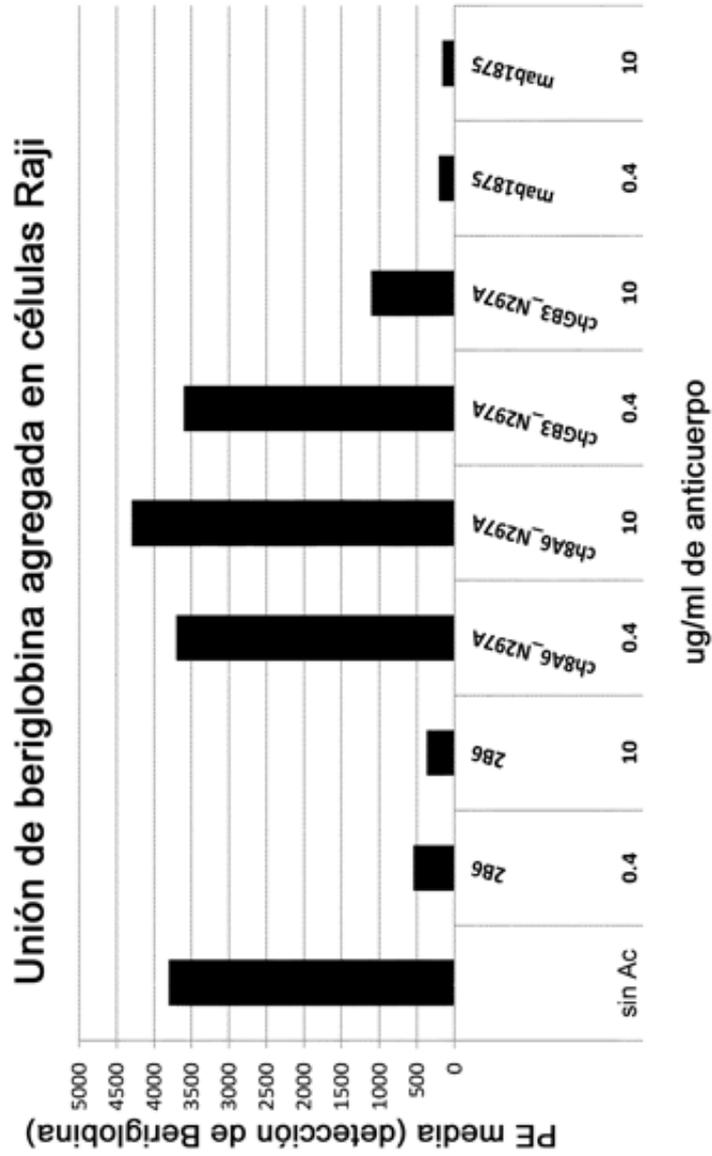


Figura 3

Figura 3: característica no bloqueante de ch8A6_N297A. Se incubaron células Raji con una cantidad establecida de IgG humana agregada y cantidades variables de ch8A6_N297A, chGB3_N297A o anticuerpos bloqueantes 2B6 o mab1875 (R&D). Los anticuerpos según la invención no son bloqueantes.

Análisis de FACS de la especificidad de unión de variantes de 8A6 humanizadas

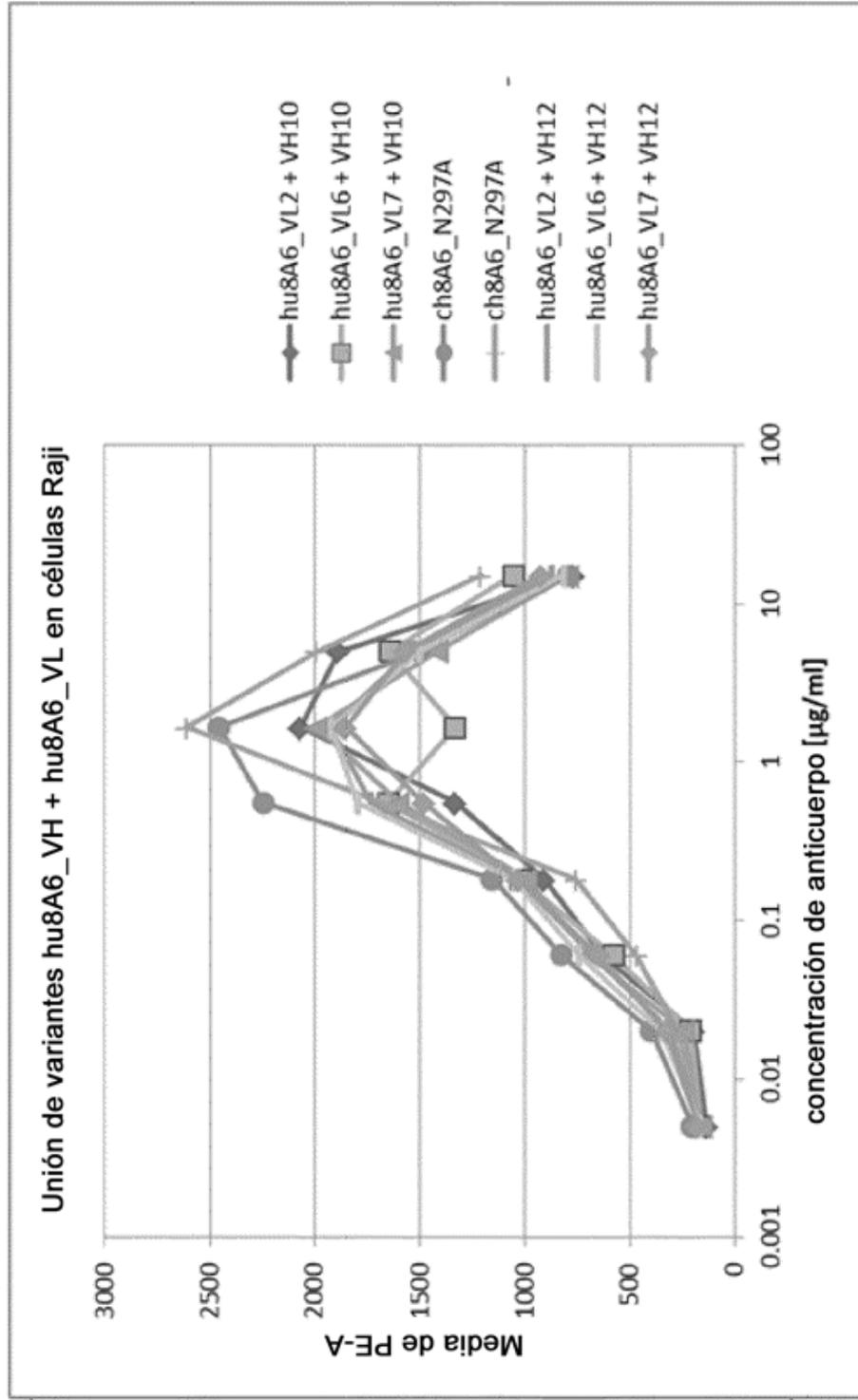


Figura 4

Figura 4: unión desde 15 µg/ml hasta 0,005 µg/ml de anticuerpo purificado con proteína A (hu8A6_VL + hu8A6_VH y ch8A6_N297A) a FcγRIIB nativo expresado en células Raji. Las variantes de 8A6 humanizadas se unen con gran avidéz a FcγRIIB expresado en células Raji.

Aumento de fosforilación de ITIM por ch8A6 en PBMC de donante sano

Figura 6a:

Ensayo de fosforilación de ITIM. Se aislaron PBMC de donantes sanos usando la separación de Ficoll y posteriormente se dejaron sin tratar o se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien 20 minutos con 5 µg/ml de ch8A6_N297A o bien tampoco como control (w/o). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β-actina = control de carga.

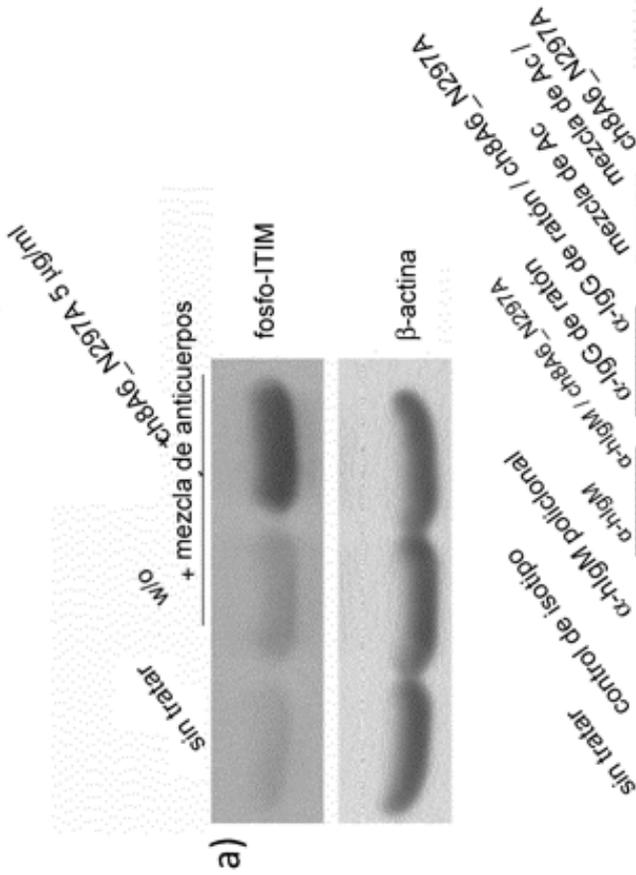


Figura 6b:

Experimento de control para la fosforilación de ITIM. Las células Daudi se dejaron sin tratar o se trataron durante 25 minutos con un anticuerpo de control de isotipo, anticuerpo anti-IgM policlonal anti-humano (anti-hlgM policlonal), anticuerpo anti-IgM humana monoclonal (anti-hlgM), anti-hlgM + ch8A6_N297A 5 µg/ml, anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (α-IgG de ratón), α-IgG de ratón + ch8A6_N297A 5 µg/ml, mezcla de anticuerpo anti-hlgM y anticuerpo α-IgG de ratón (mezcla de Ac) o mezcla de Ac + ch8A6_N297A 5 µg/ml. β-actina = control de carga.

Figura 6

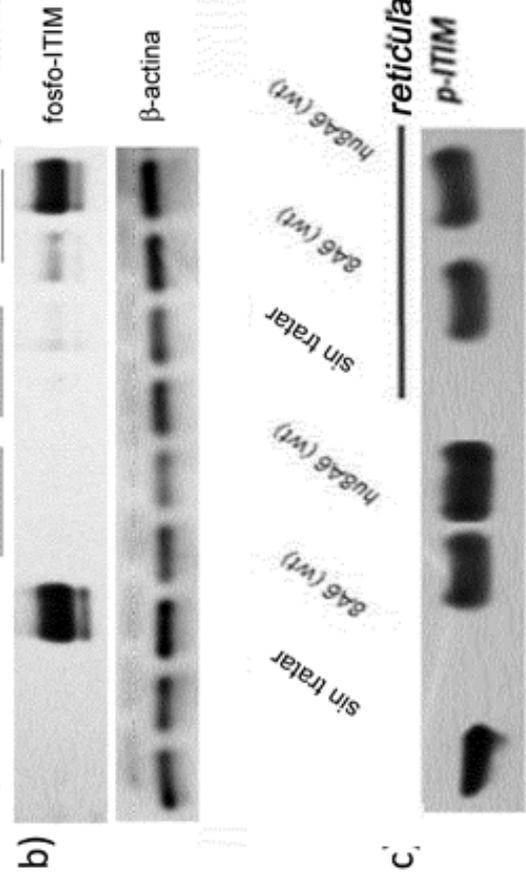
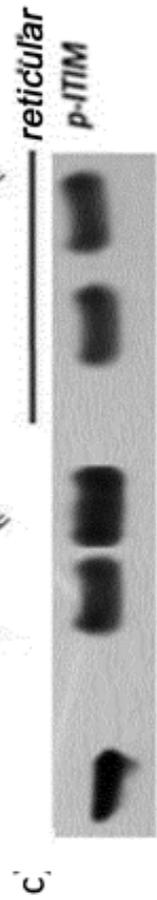


Figura 6c:

8A6 (wt) así como hu8A6 mostraron una fuerte fosforilación de RIIB de Fc gamma sin la necesidad de un coligamiento precedente de BCR y FcgRIIB. Después de la reticulación de los receptores mediante la mezcla de anticuerpos, 8A6 (wt) y hu8A6 fueron capaces, tal como se esperaba, de inducir la fosforilación de ITIM.



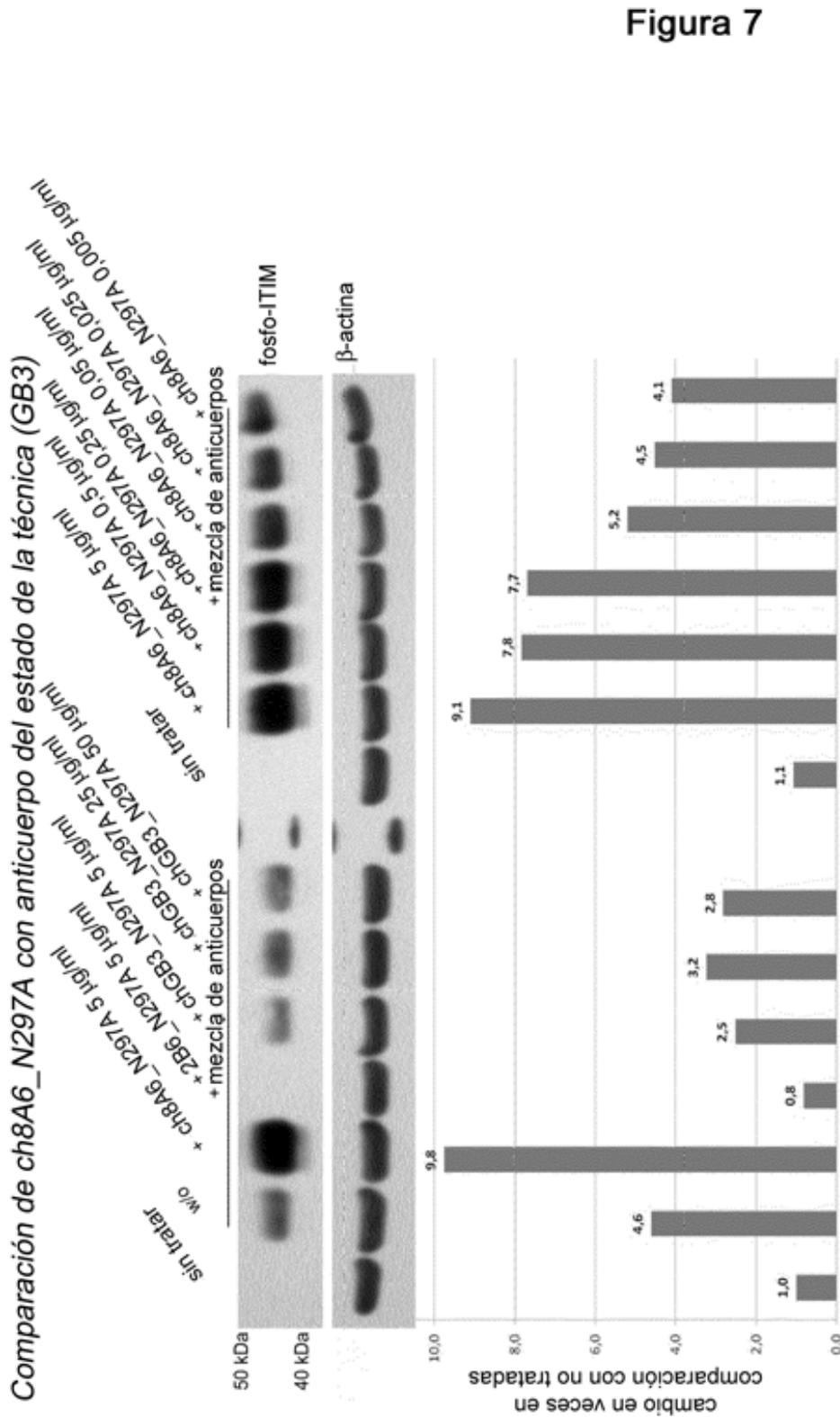


Figura 7: Ensayo de fosforilación de ITIM. Las células Daudi o bien se dejaron o bien sin tratar o bien se incubaron durante 25 minutos con una mezcla de anticuerpos que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien durante 20 minutos con cantidades variables de chGB3_N297A o ch8A6_N297A o bien tampón como control (w/o). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β -actina = control de carga.

Comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A sobre la fosforilación de ITIM en PBMC primarias

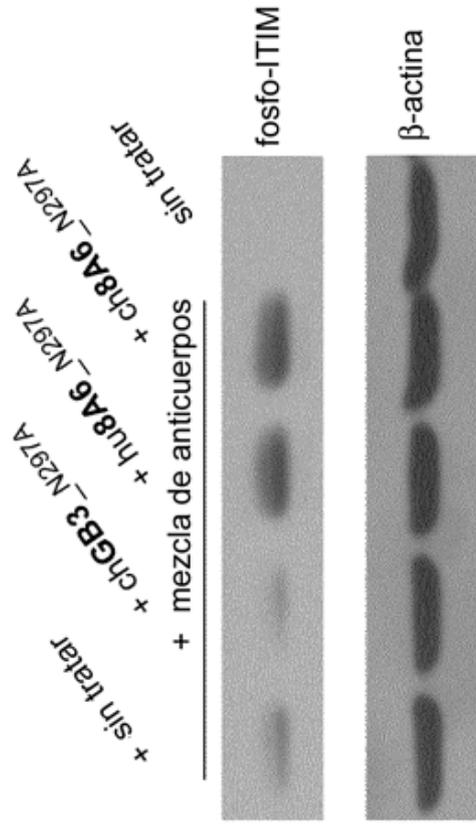


Figura 8

Figura 8: comparación del efecto de la variante humanizada hu8A6_N297A y ch8A6_N297A sobre la fosforilación de ITIM en PBMC primarias. Después de la reticulación de BCR y FcγRIIB por la mezcla de anticuerpos, se añadieron los diferentes anticuerpos a 5 µg/ml y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosforilación de ITIM. β-actina = control de carga.

Coinmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilada con FcγRIIB

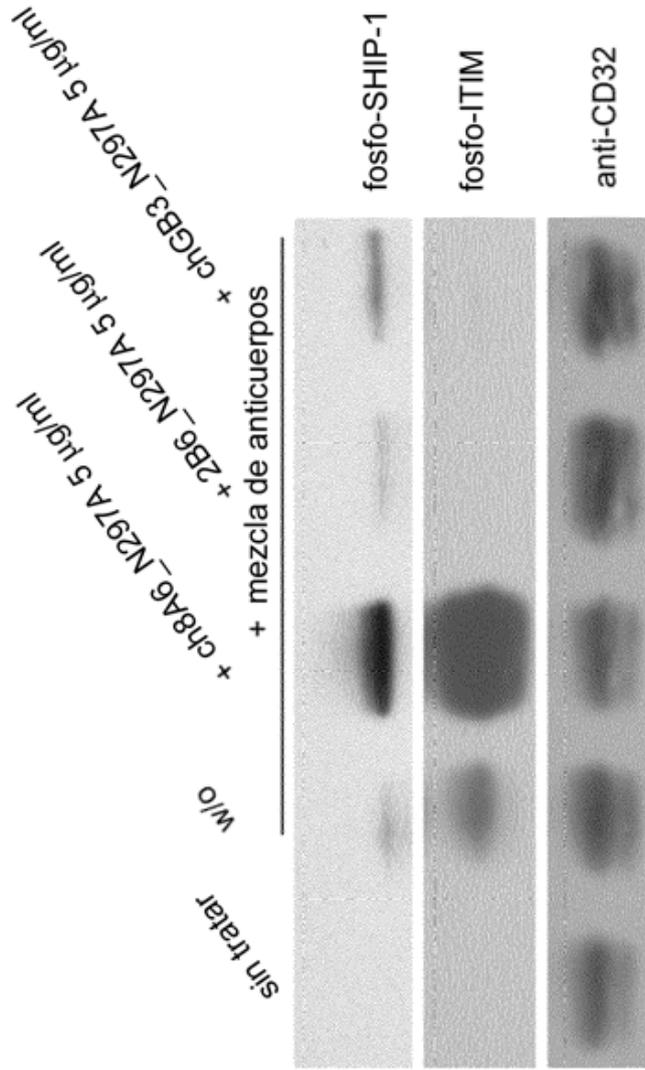


Figura 9

Figura 9: coinmunoprecipitación de SHIP-1 fosforilada con ITIM de FcγRIIB. Después de la estimulación de las células Daudi con la mezcla de anticuerpos y ch8A6_N297A, anticuerpo bloqueante anti-FcγRIIB 2B6 o chGB3_N297A (5 µg/ml), se precipitó FcγRIIB de los lisados celulares y se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la fosfatasa SHIP-1. Anticuerpo anti-CD32 que usa anticuerpo anti-CD32 de bandeja (AF1330) = control de carga.

Figura 10

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A

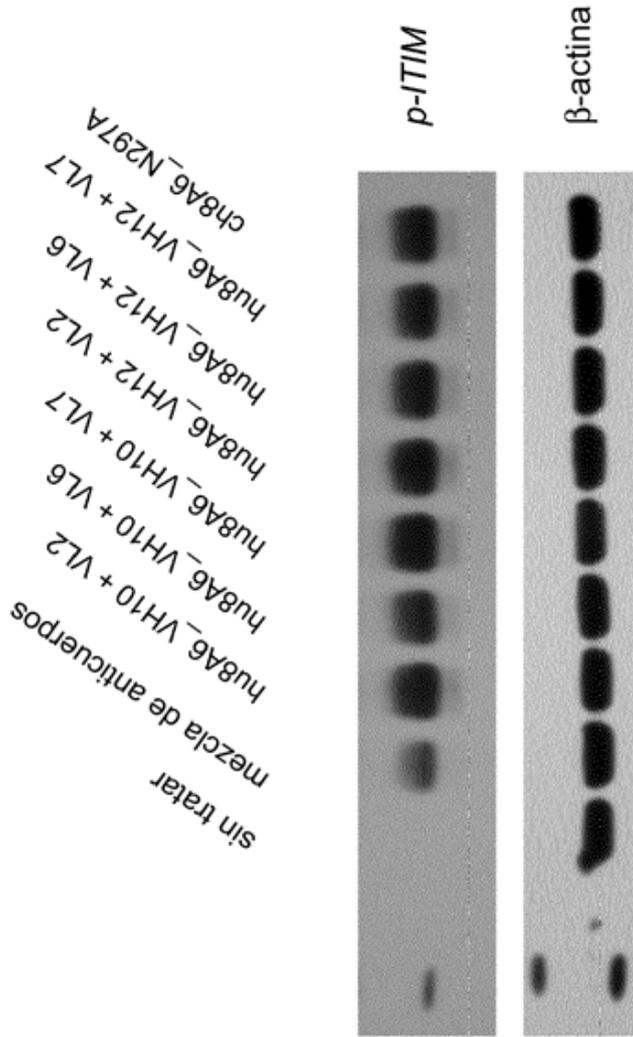


Figura 10:
 Ensayo de fosforilación de ITIM. Las células Daudi se dejaron incubar durante 25 minutos con tampón (sin tratar) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien 20 minutos con 0,25 µg/ml de ch8A6_N297A o bien variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL6 / VH10 + VL2 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7). Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β-actina = control de carga.

Comparación de variantes de 8A6 humanizadas con ch8A6_N297A, 2B6 y chGB3_N297A

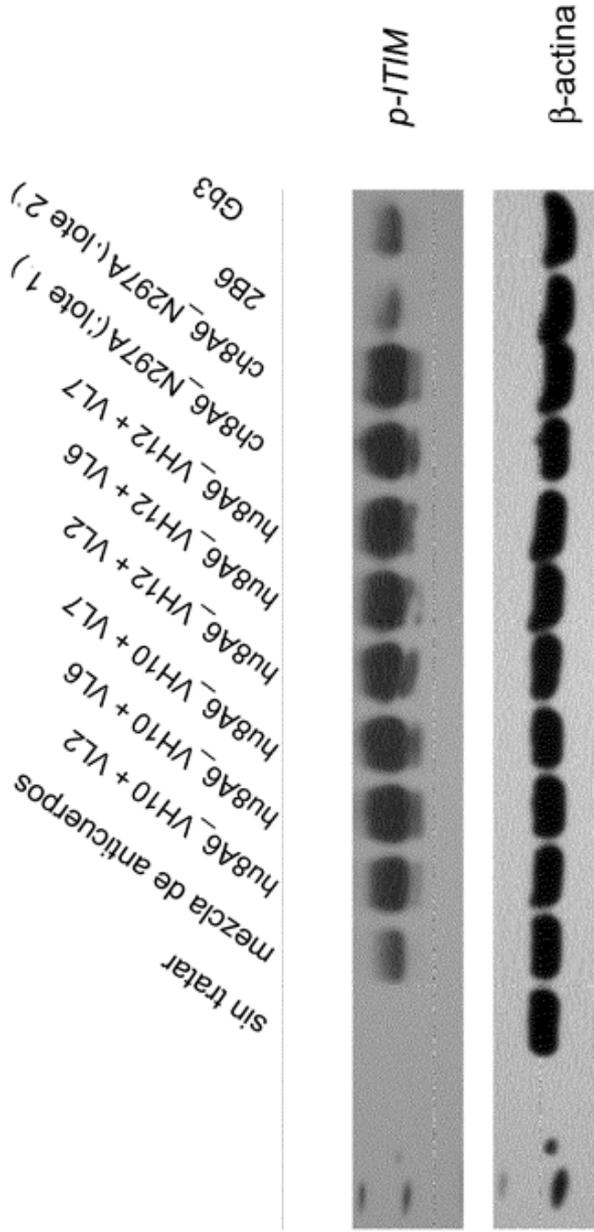


Figura 11

Figura 11:
 Ensayo de fosforilación de ITIM. Las células Daudi se dejaron incubar durante 25 minutos con tampón (sin tratar) o una mezcla (mezcla de anticuerpos) que contenía anticuerpo anti-IgM (anti-humano, ratón) y anticuerpo anti-IgG de ratón (conejo). Posteriormente, las células se trataron o bien 20 minutos con 0,25 µg/ml de ch8A6_N297A, variantes de 8A6 humanizadas (hu8A6_VH10 + VL2 / VH10 + VL6 / VH10 + VL7 / VH12 + VL2 / VH12 + VL6 / VH12 + VL7), 2B6 bloqueante o bien chGB3_N297A. Las células se recogieron después de la incubación y se lisaron según el protocolo. Los lisados se sometieron a análisis de WB. β-actina = control de carga.

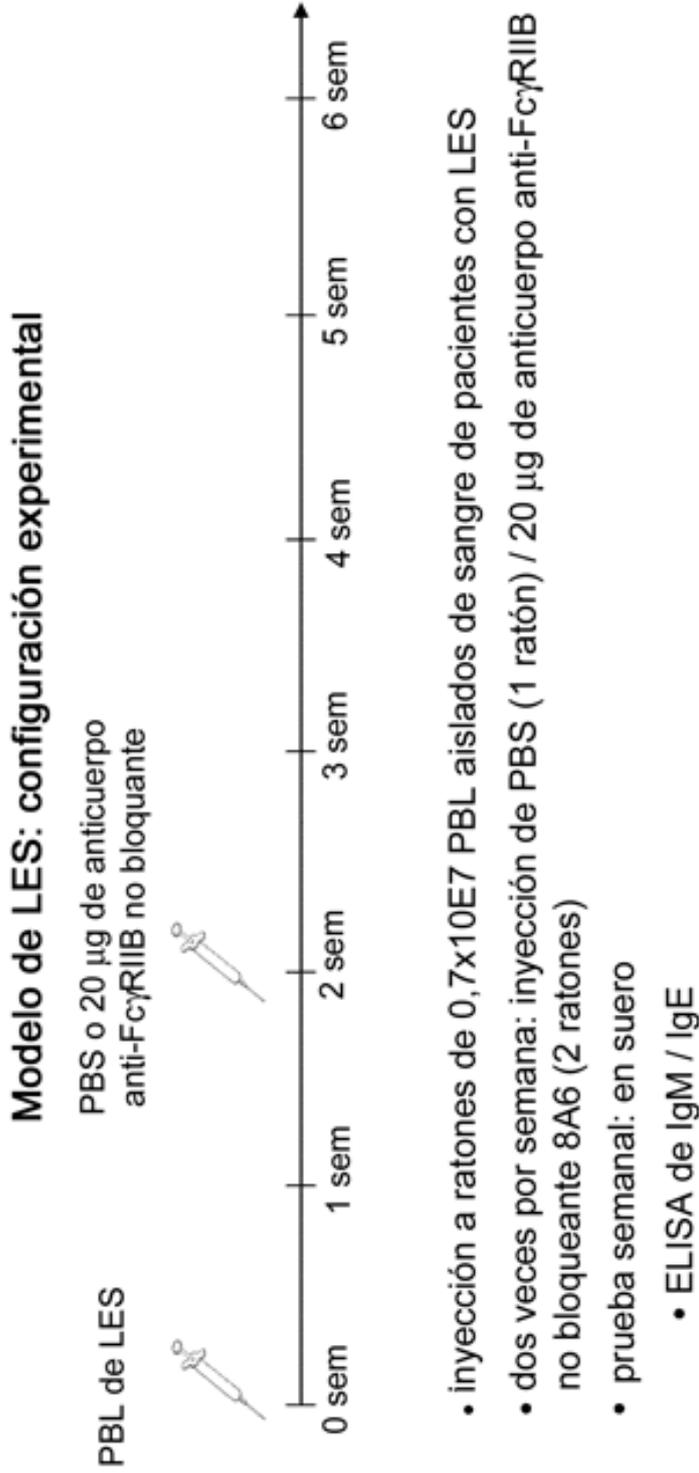


Figura 12

Figura 12: configuración experimental para el modelo de ratón de PBL de LES. Se transfieren PBL de pacientes humanos con LES a ratones inmunosuprimidos. Se injertan las células PBL y los ratones se tratan posteriormente con control (PBS) o anticuerpo anti-FcγRIIB ch8A6_N297A según la invención.

Modelo de PBL de LES, inmunoglobulina humana total en suero

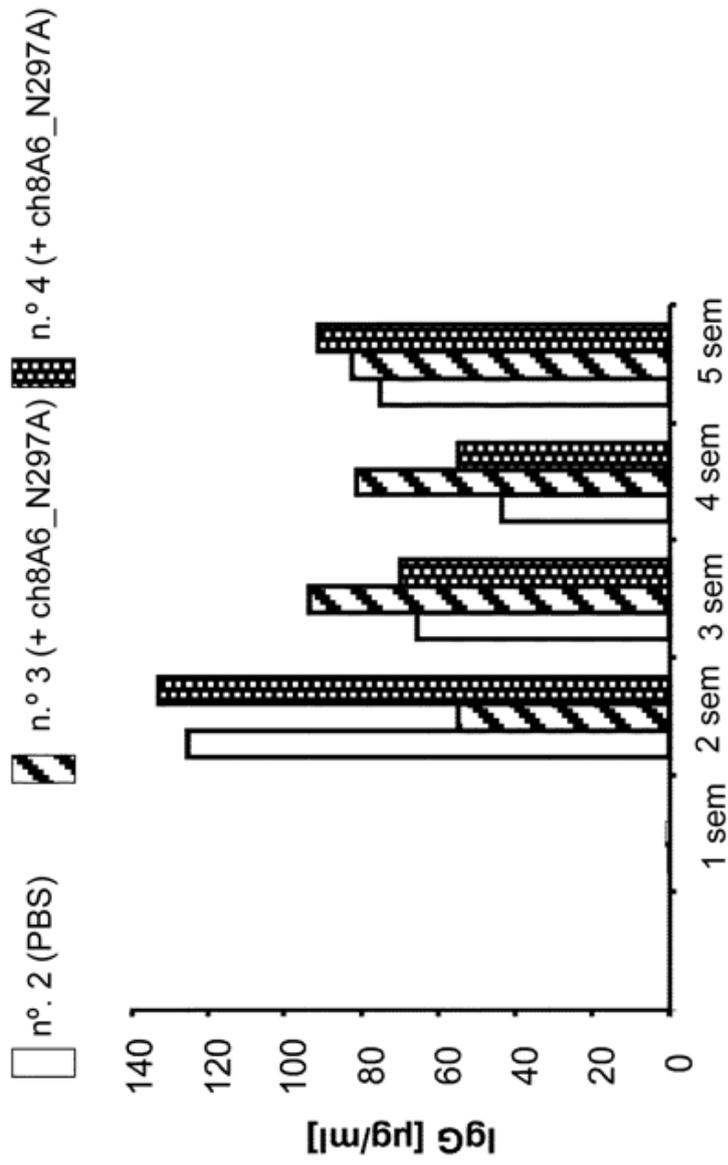


Figura 13

Semanas tras la transferencia de PBL

Figura 13: Nivel total de IgG humana [µg/ml] en ratones injertados con PBL de donantes humanos que padecen LES. Se representan ratones tratados con control (n.º 2, PBS) o 8A6 quimérico = ch8A6_N297A (n.º 3 y n.º 4, anticuerpo anti-FcγRIIB, formato N297A). No hay diferencia significativa en la IgG humana total entre PBS o anticuerpo anti-FcγRIIB.

Modelo de PBL de LES, influencia sobre anticuerpos anti-ADN (IgG específica de la enfermedad)

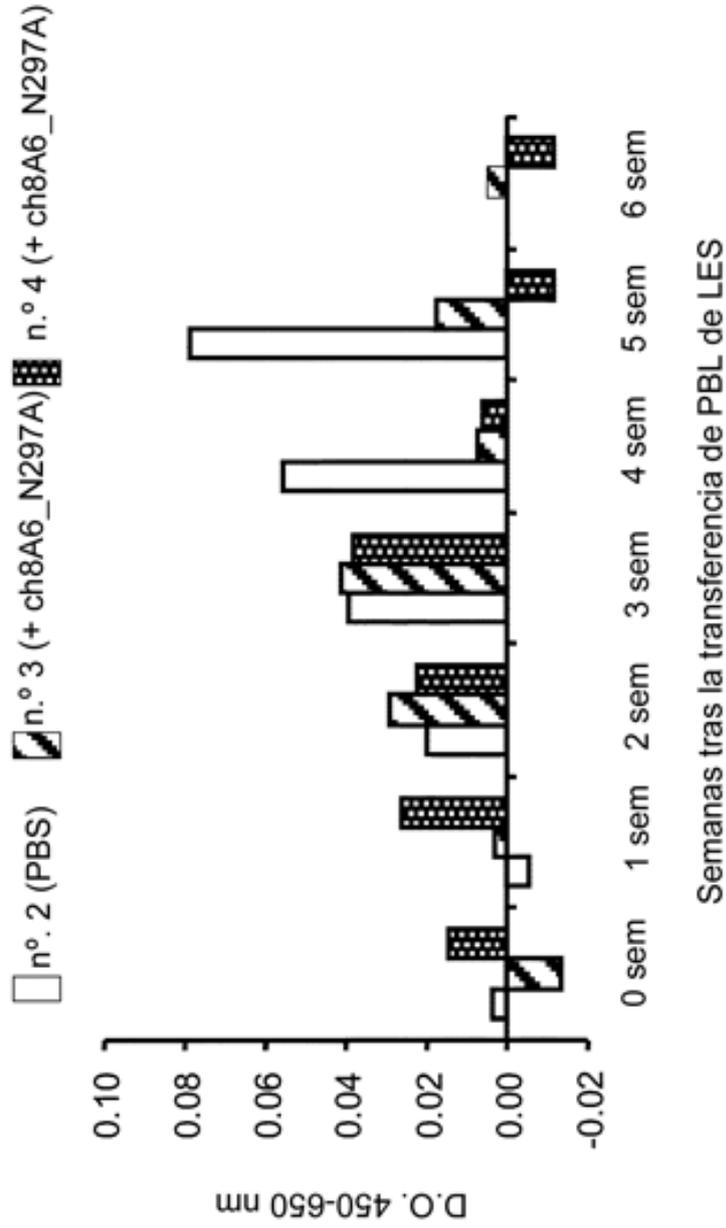


Figura 14

Figura 14:
 Reducción de IgG anti-ADN humano específica de la enfermedad en ratones tratados con ch8A6_N297A a partir de la semana 4 después de la transferencia/injerto de PBL de LES. Se muestran títulos de IgG anti-ADN en dos ratones diferentes, n.º 3 y n.º 4 (tratados con ch8A6_N297A), el n.º 2 muestra el control de PBS.

Figura 15

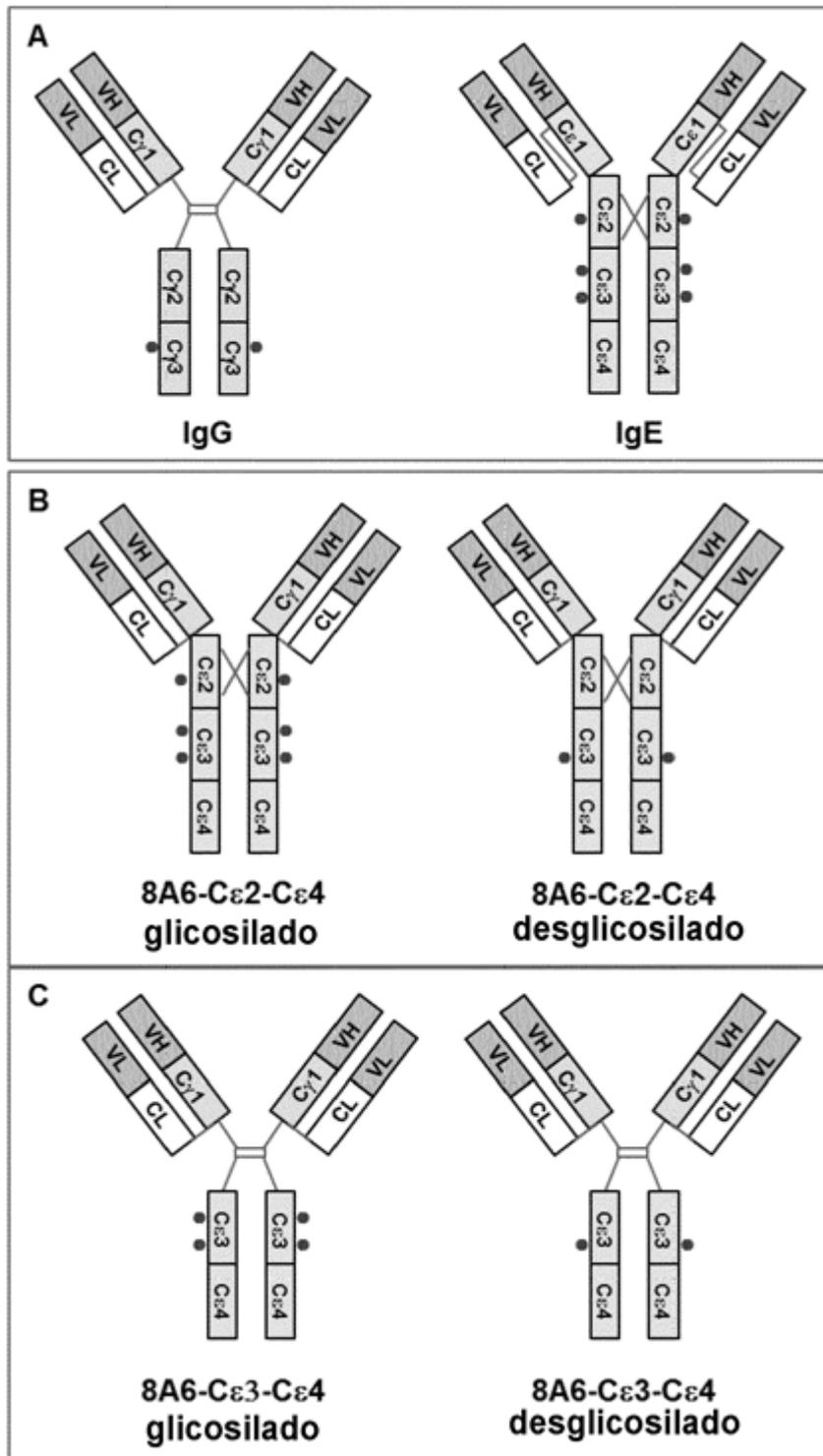


Figura 16

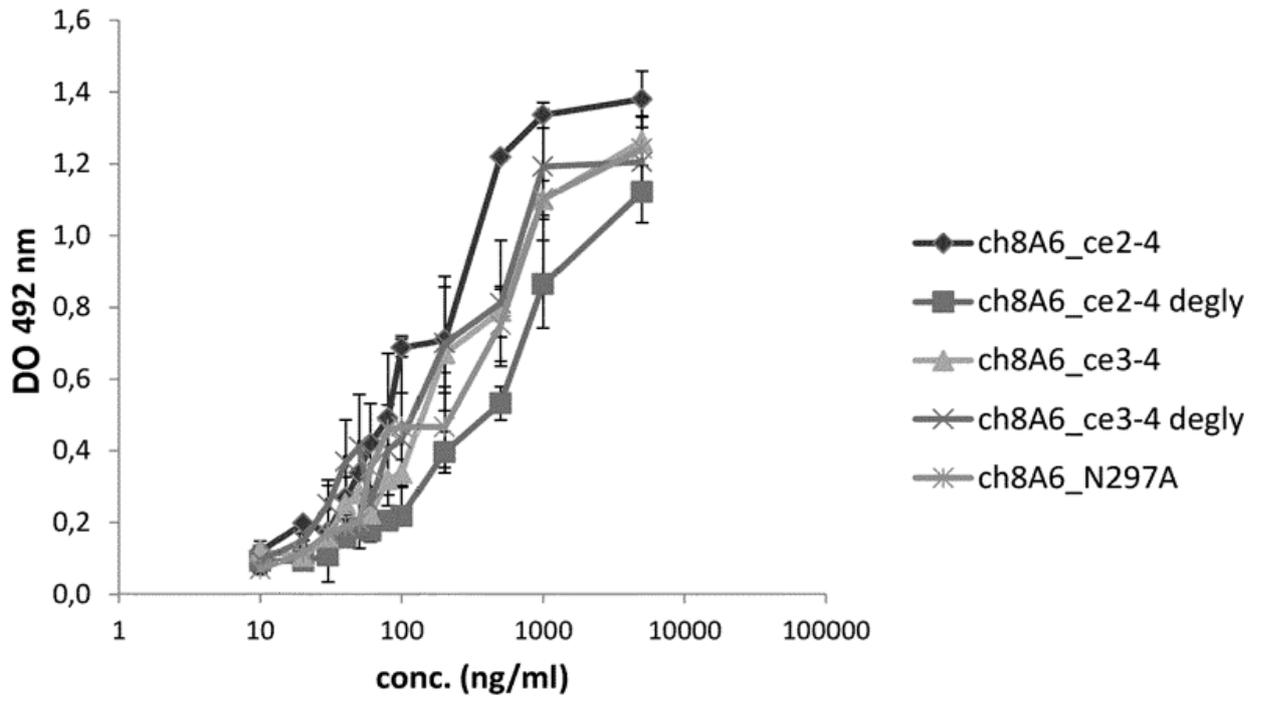


Figura 17

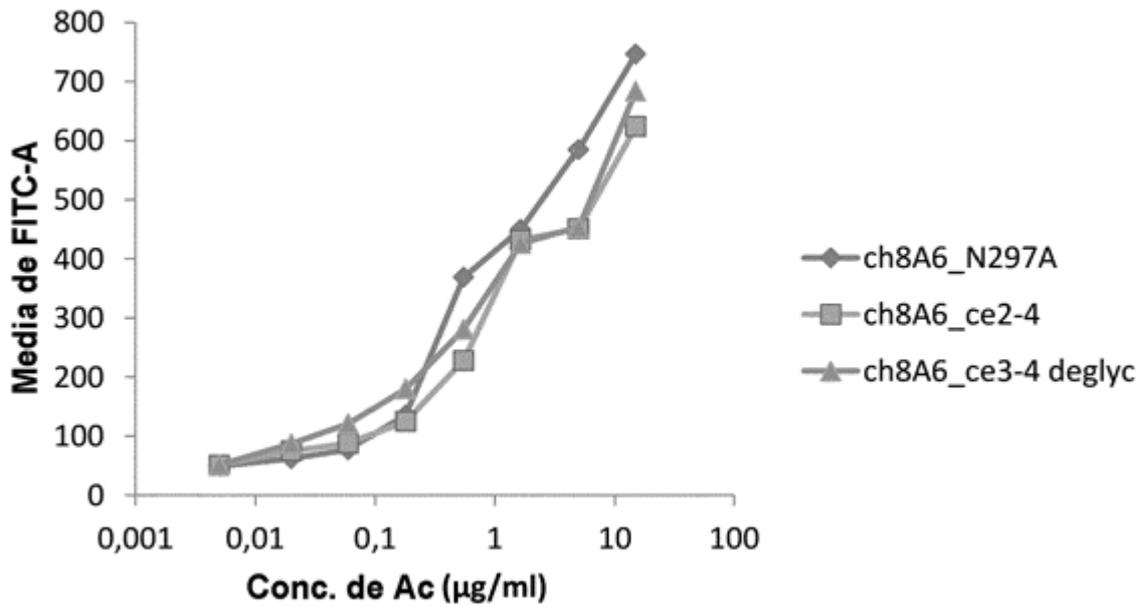
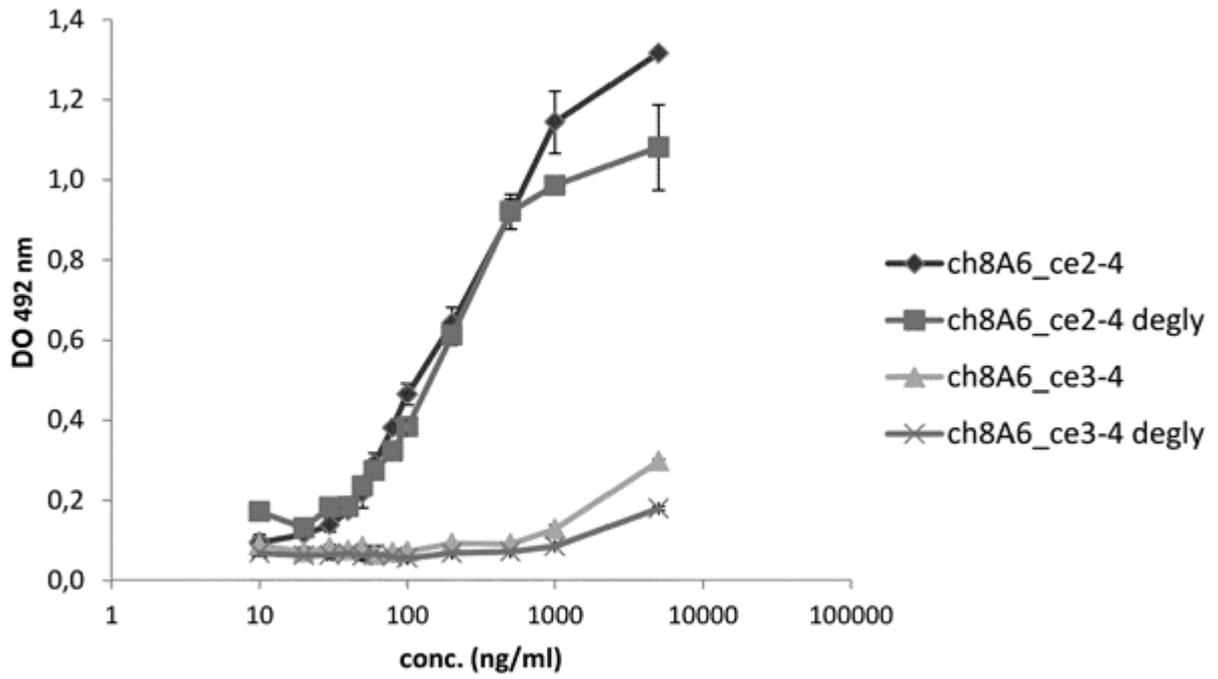


Figura 18

Figura 19

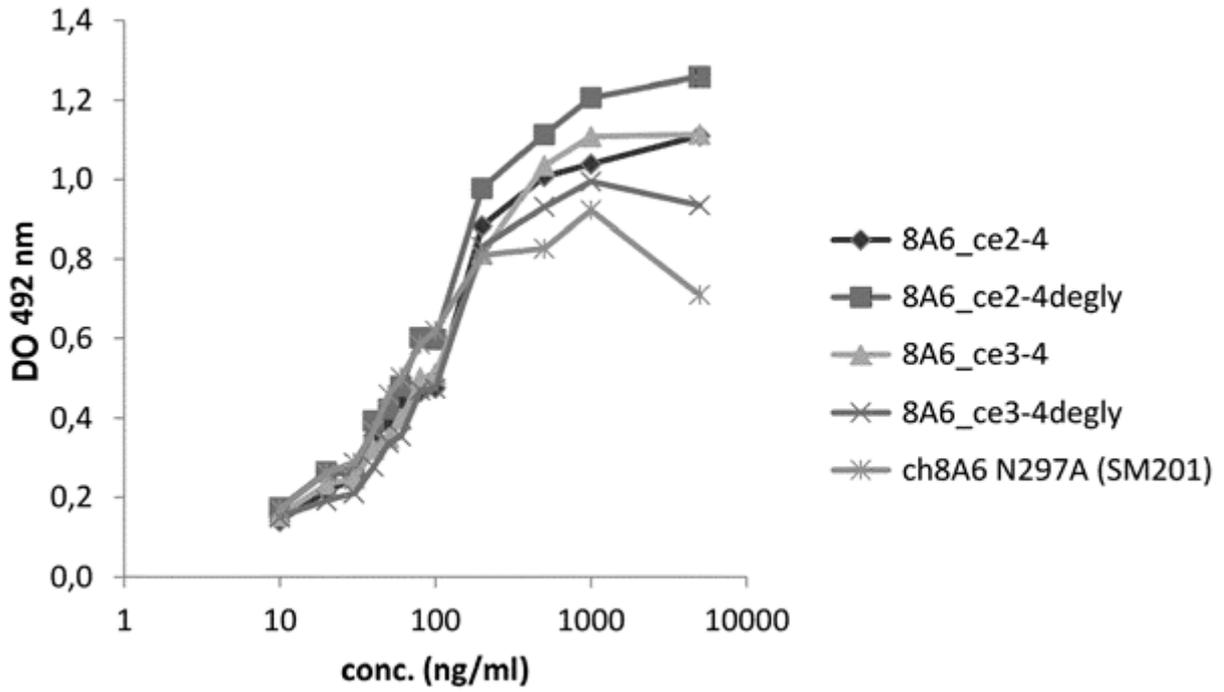


Figura 20

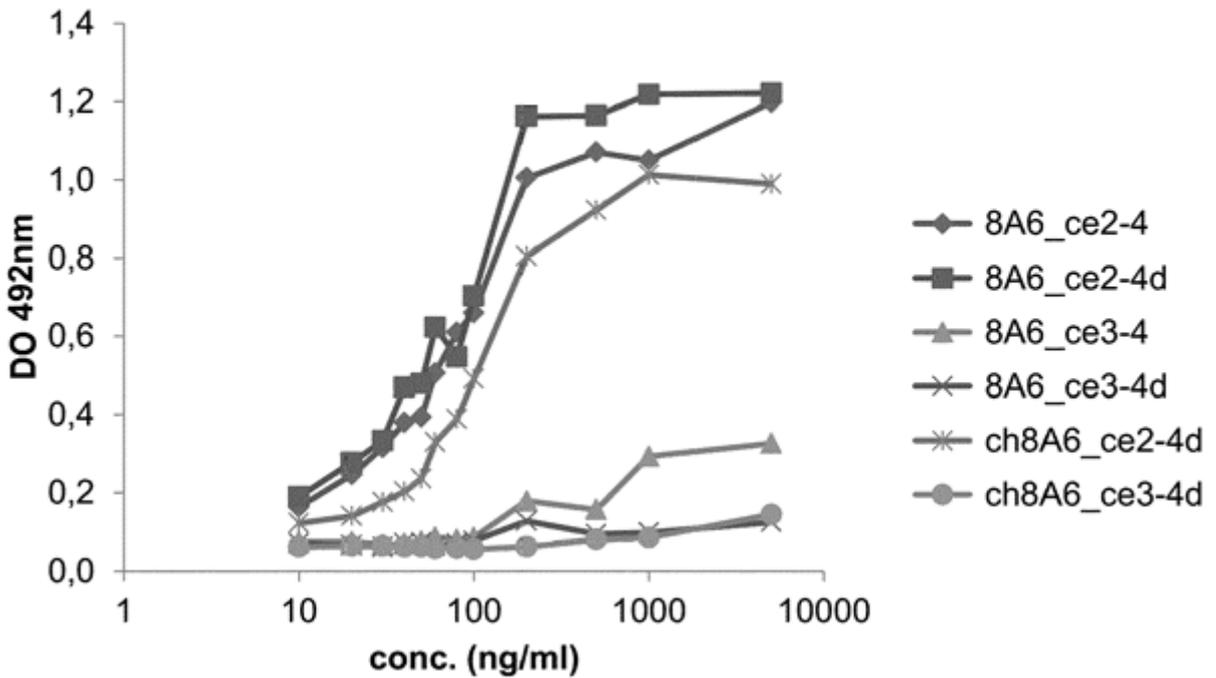
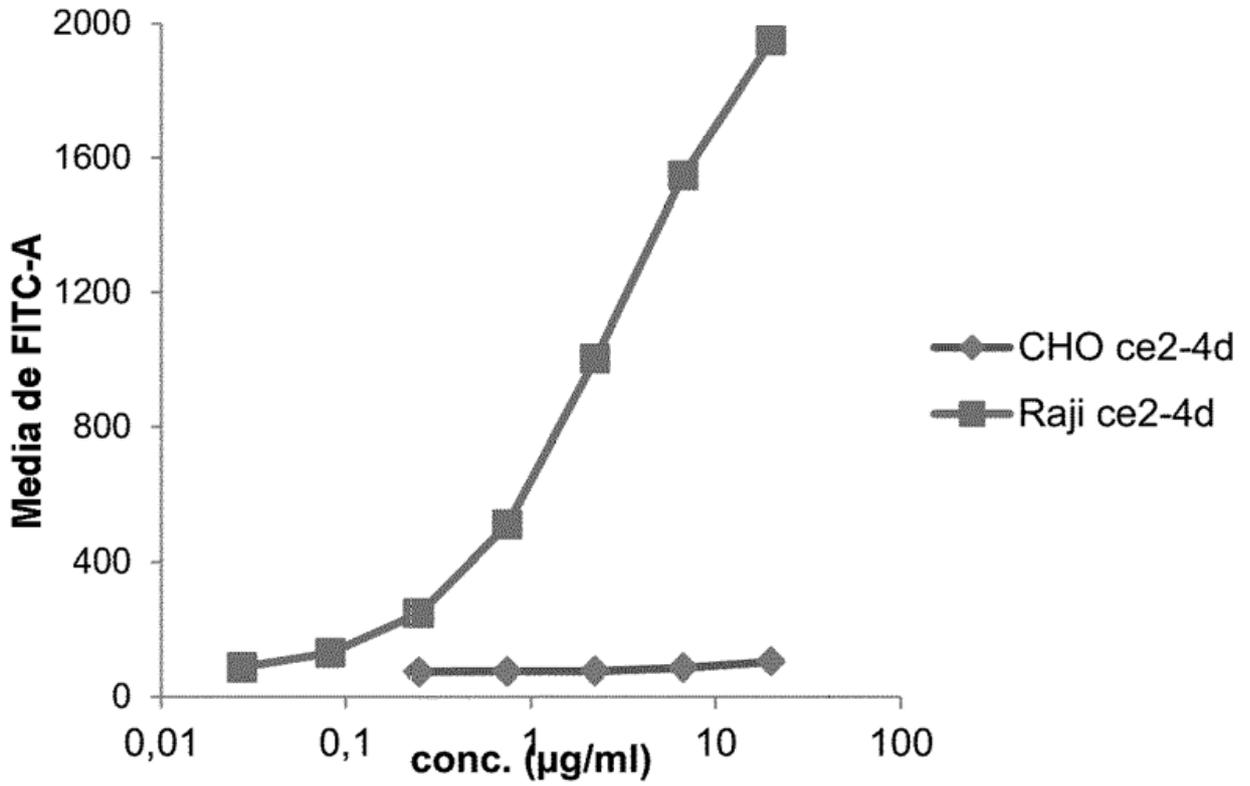


Figura 21



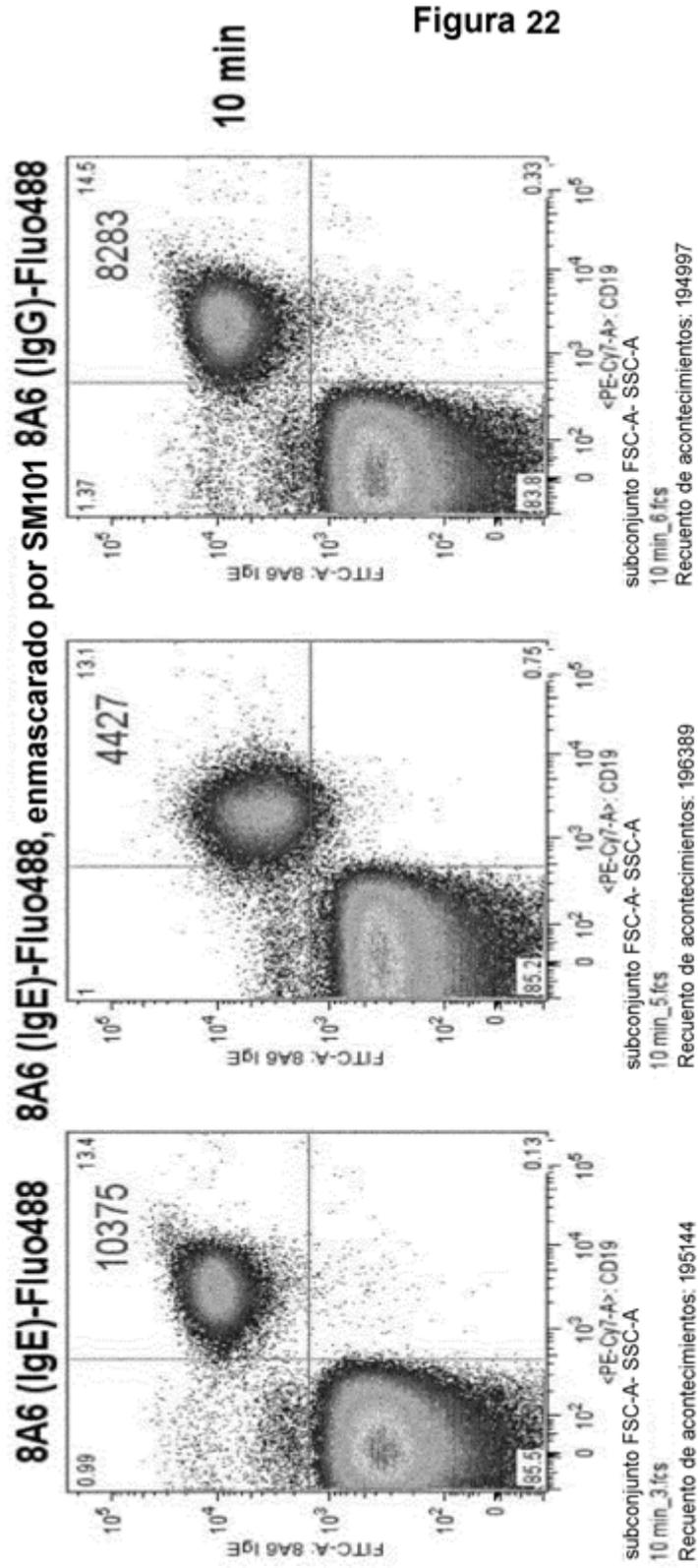


Figura 22

Figura 22 (cont.)

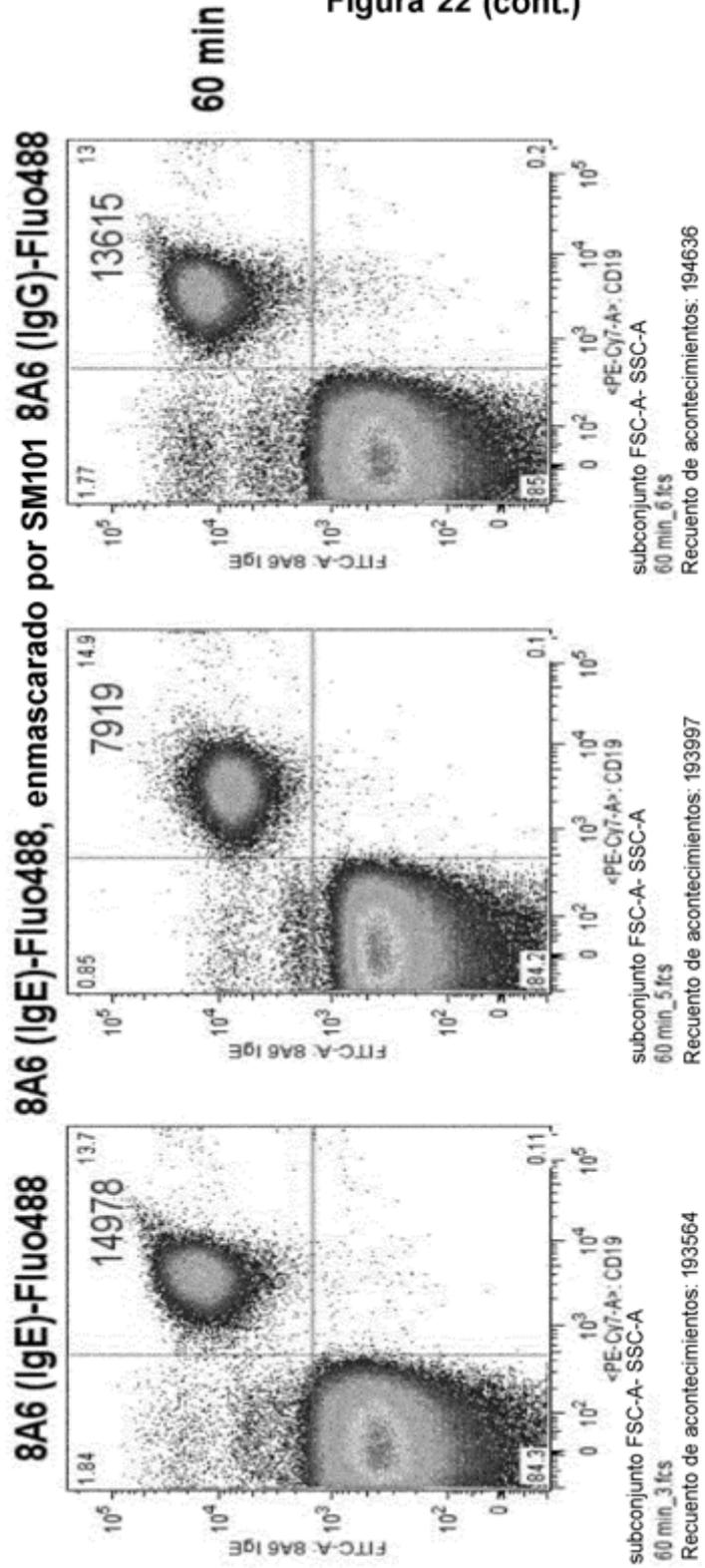


Figura 22 (cont.)

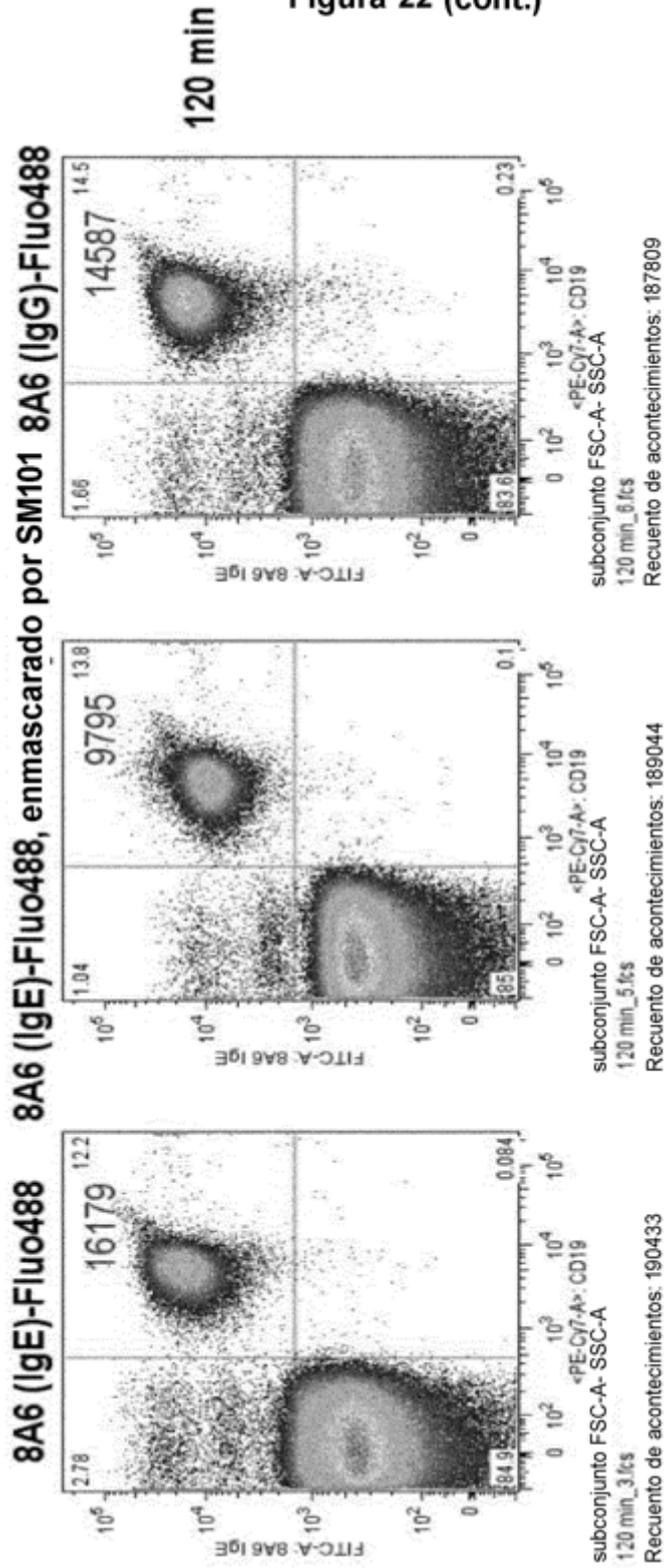


Figura 22 (cont.)

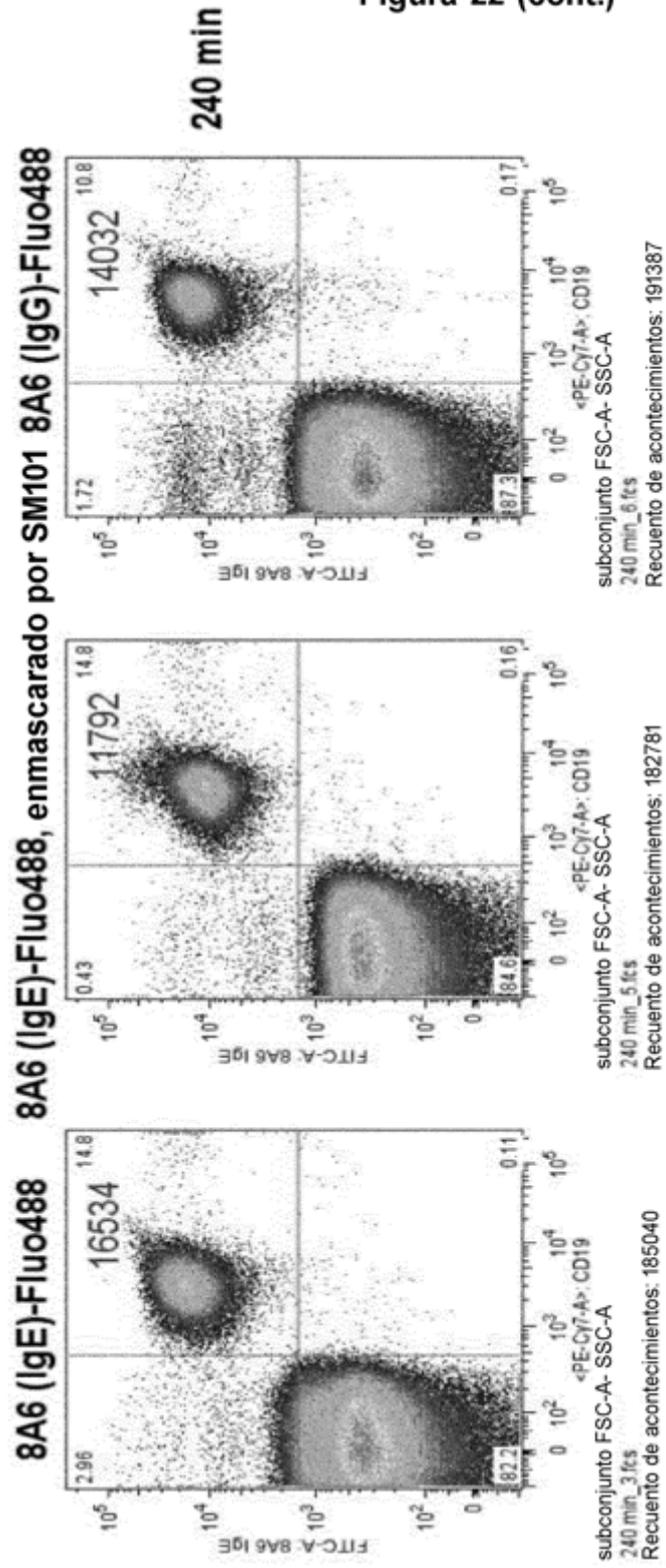
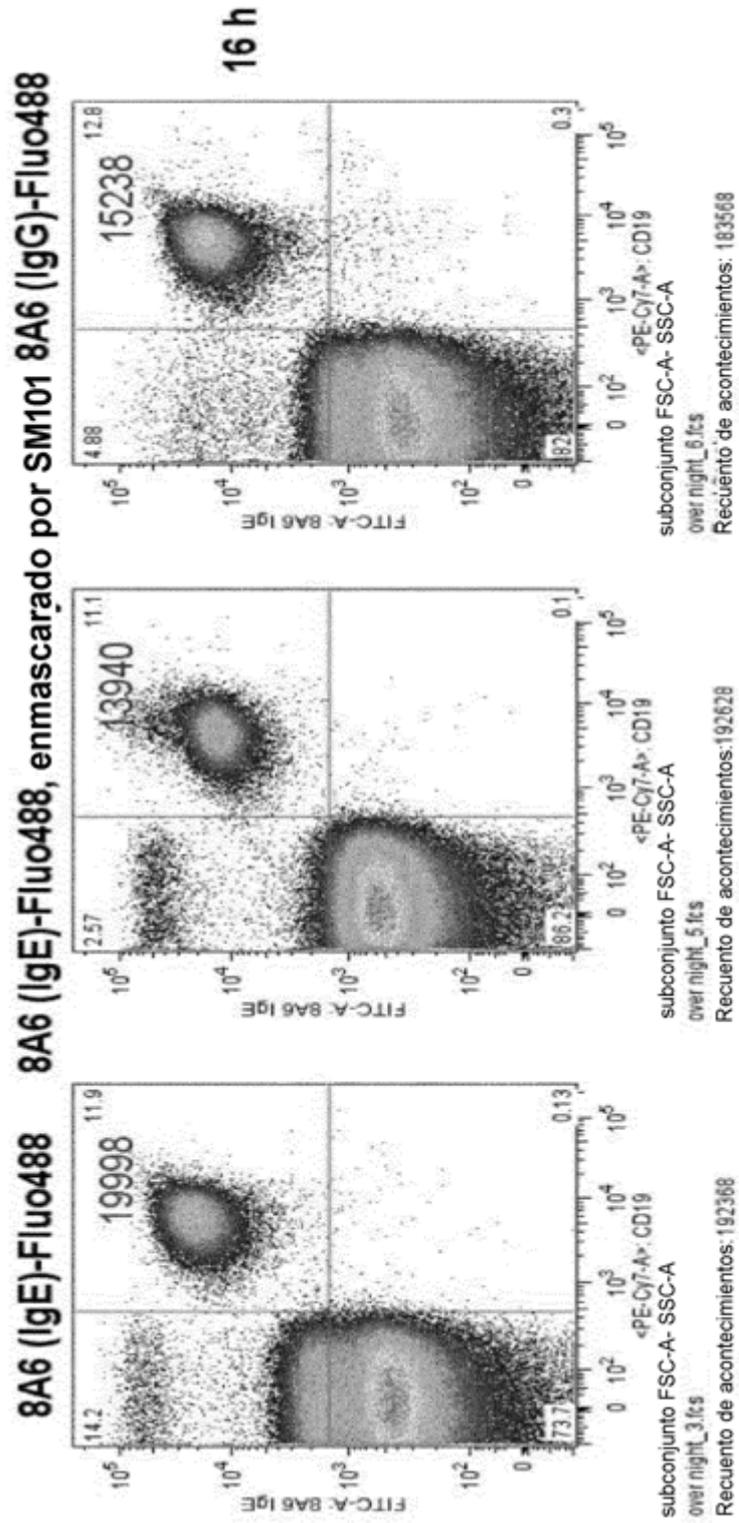


Figura 22 (cont.)



Estrategia de selección mediante CD193 y SSC en FACS

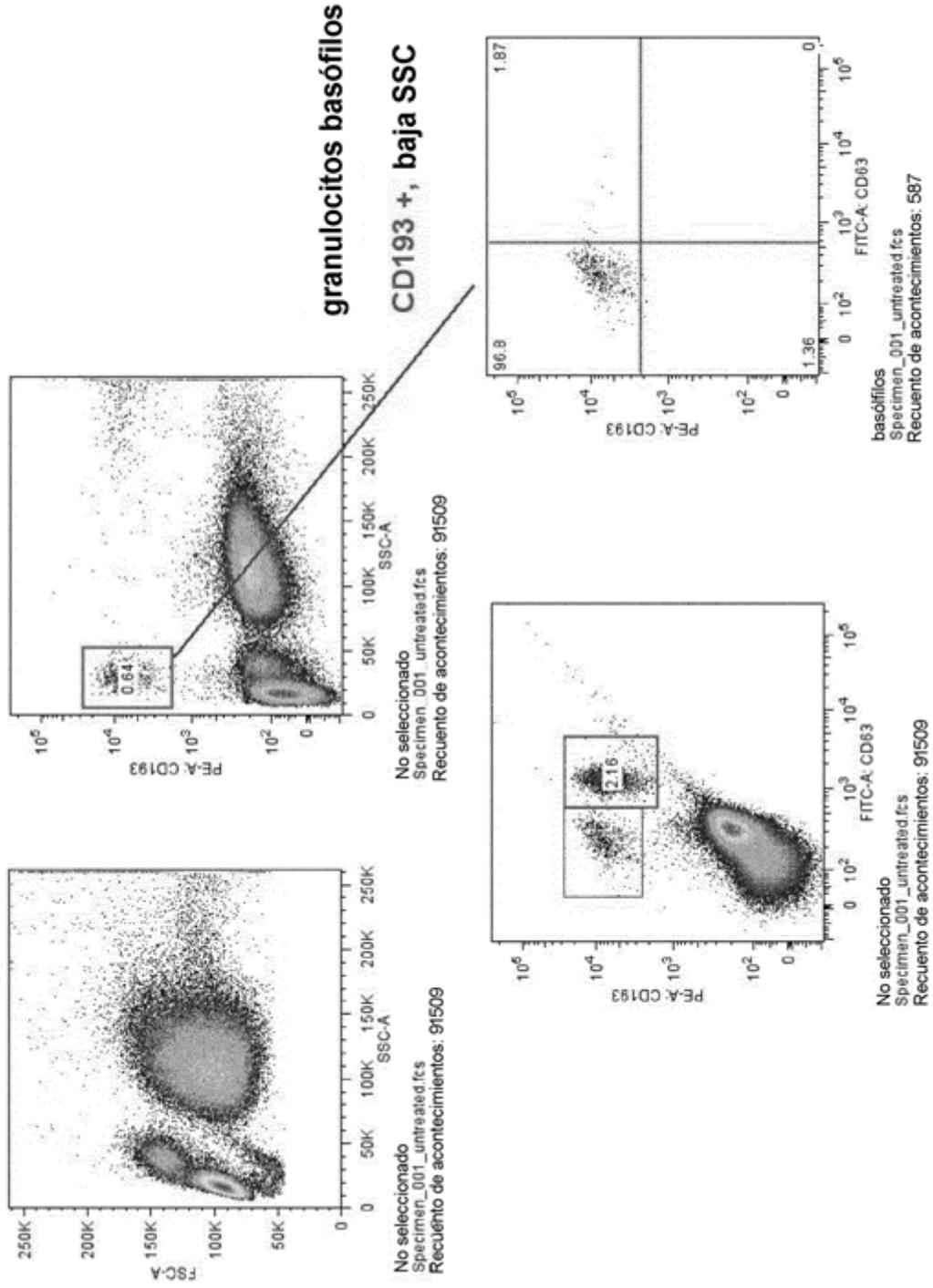
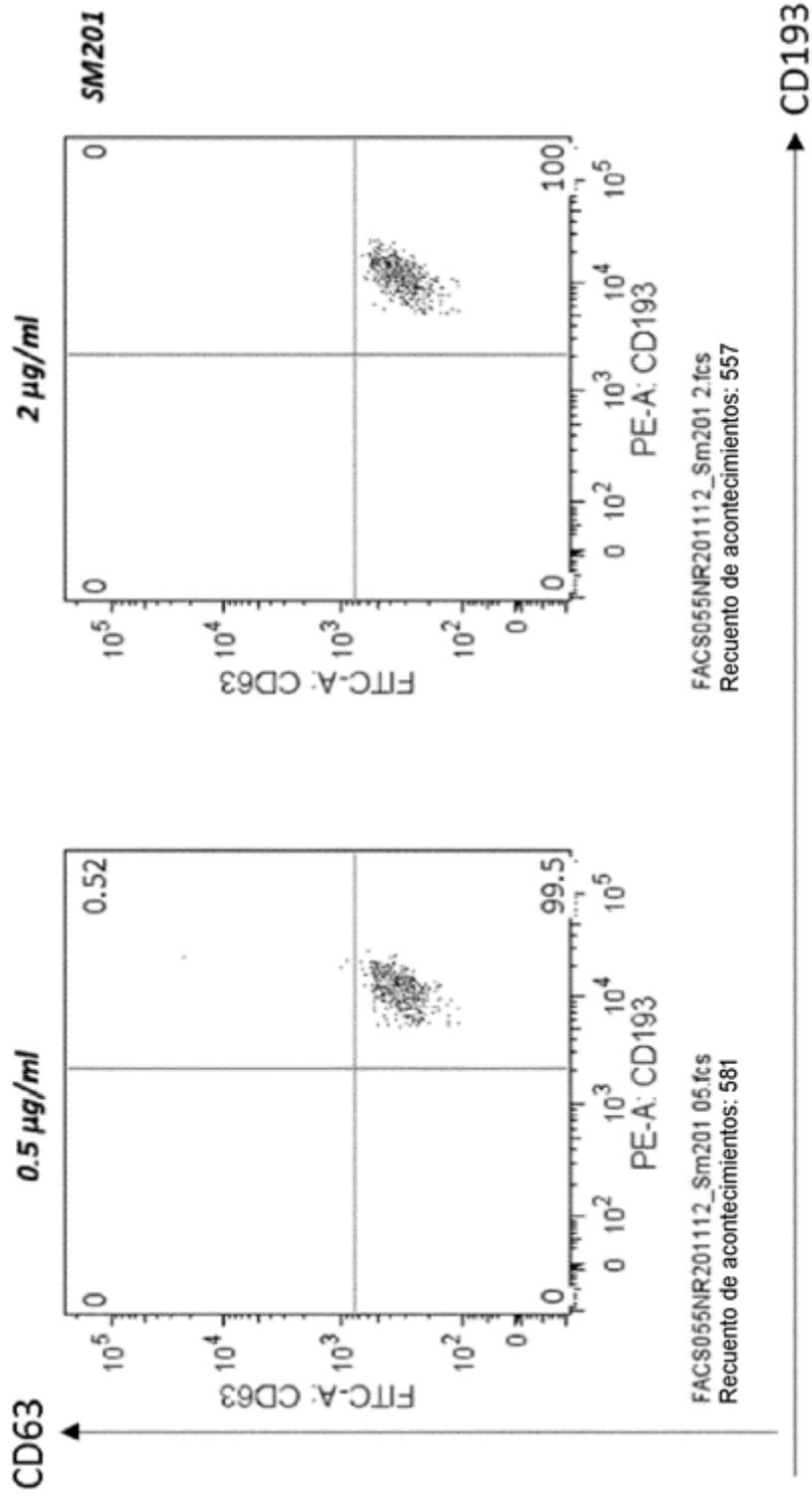
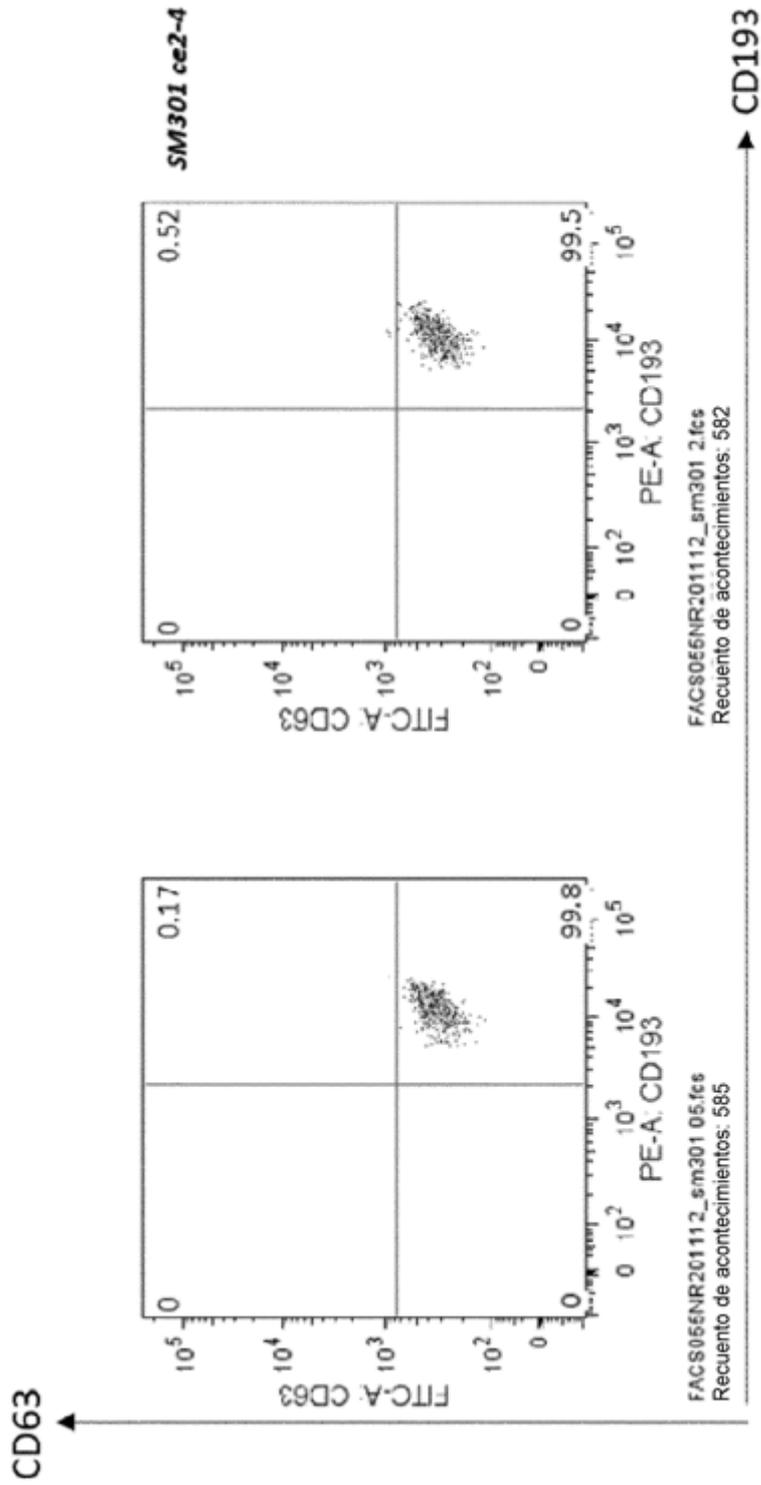


Figura 24



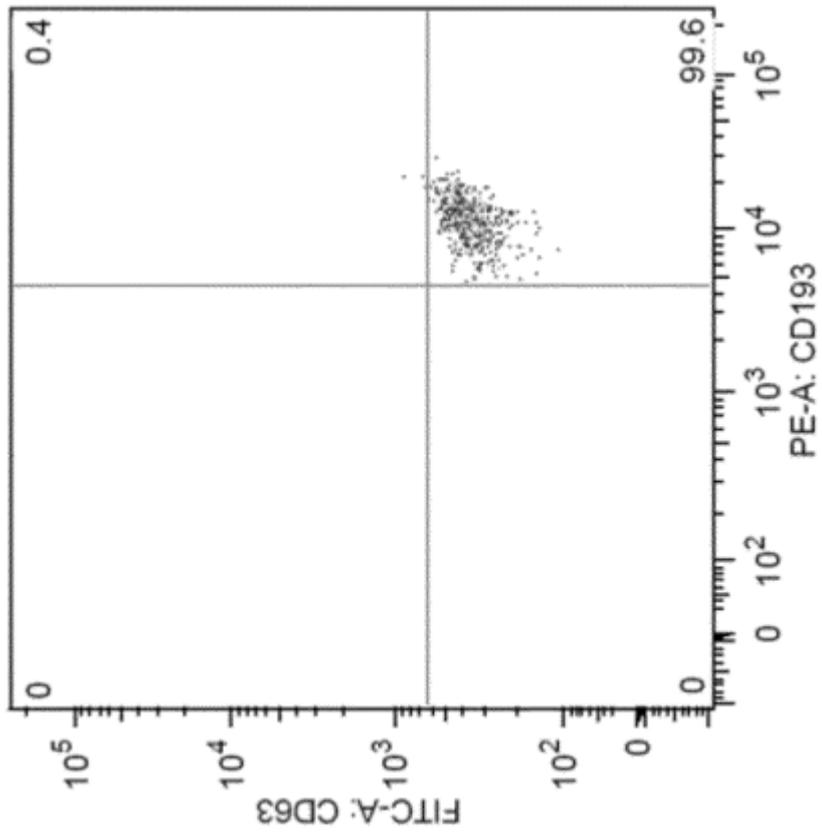
8A6_N297A
0.5 µg/ml (lado izquierdo)
2 µg/ml (lado derecho)

Figura 24 (cont.)

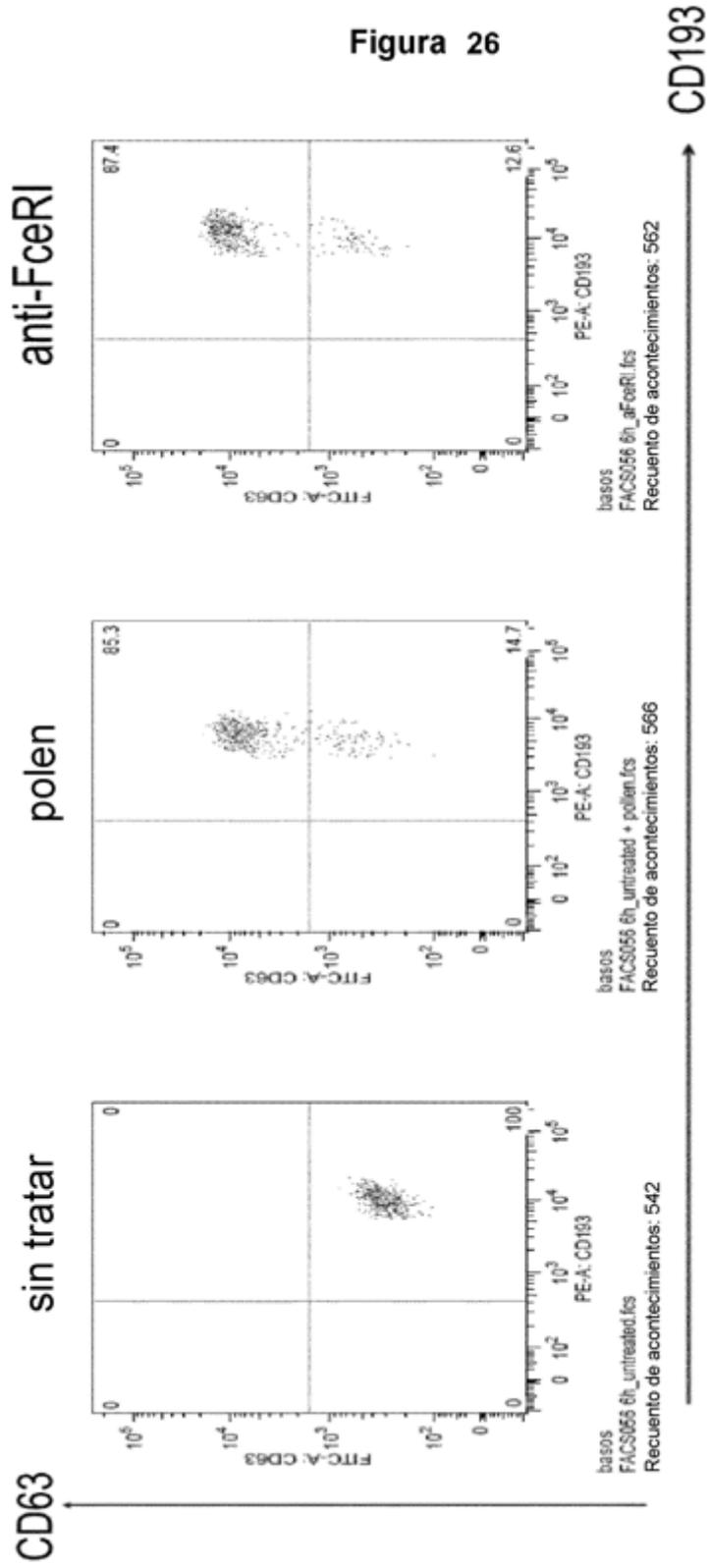


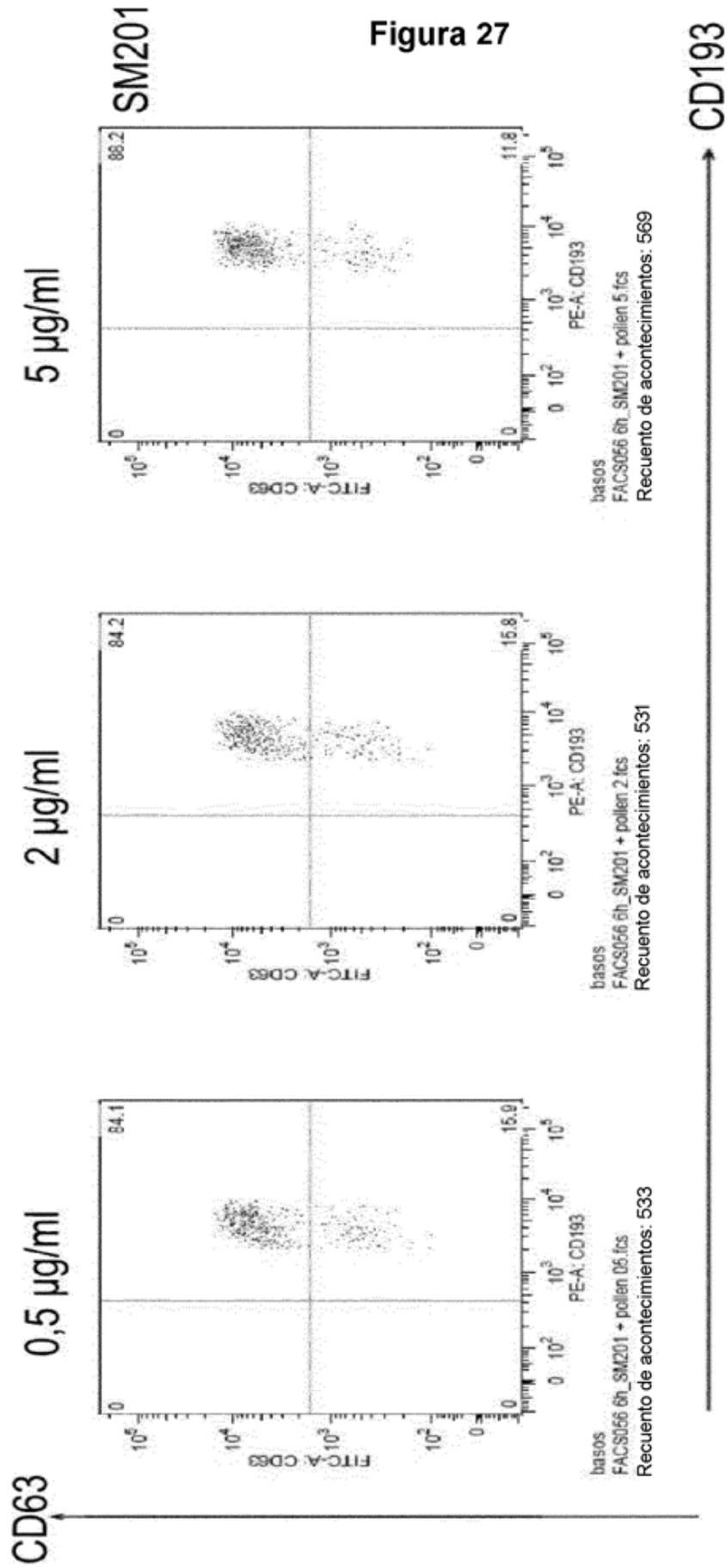
8A6_cc2-4-degly
0.5 µg/ml (lado izquierdo)
2 µg/ml (lado derecho)

Figura 25



basos
BAT211112 24h_LPS control_001.fcs
Recuento de acontecimientos: 495





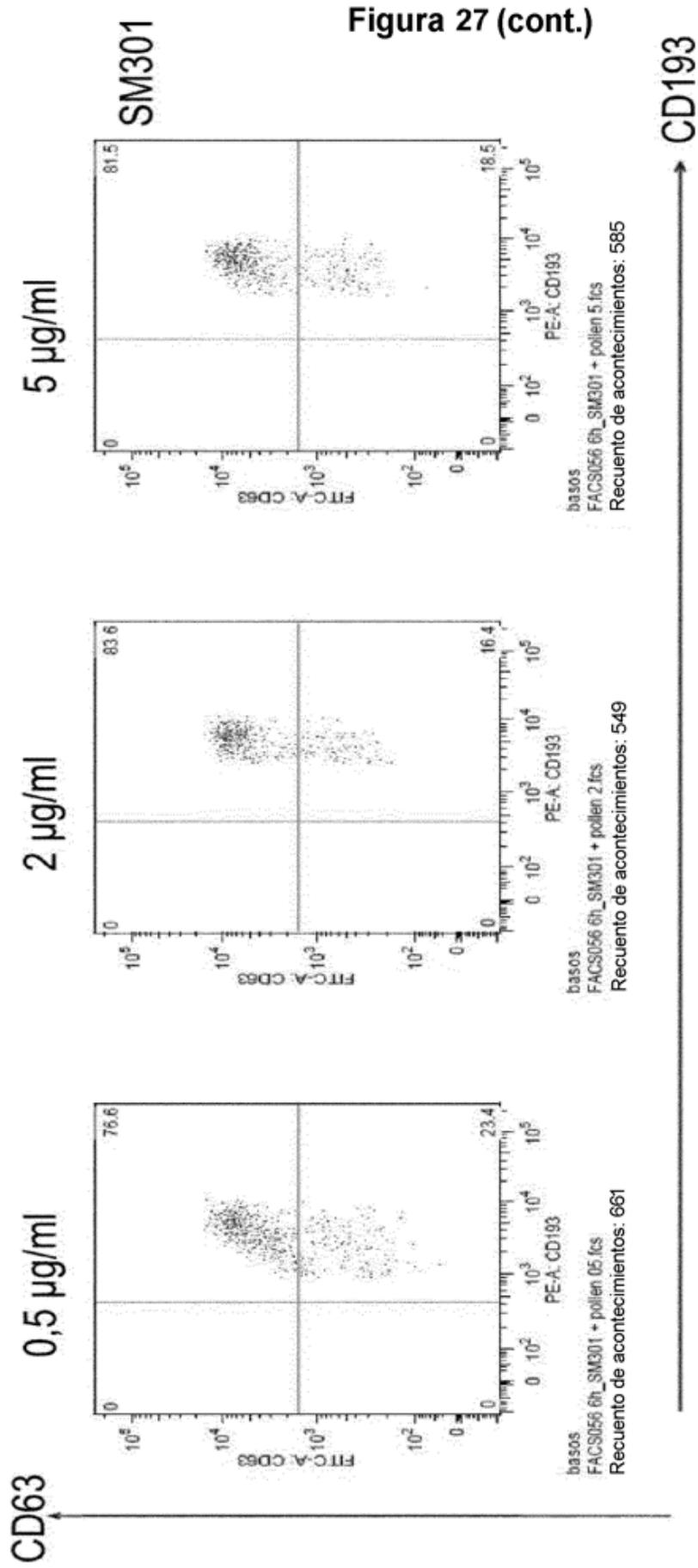


Figura 28

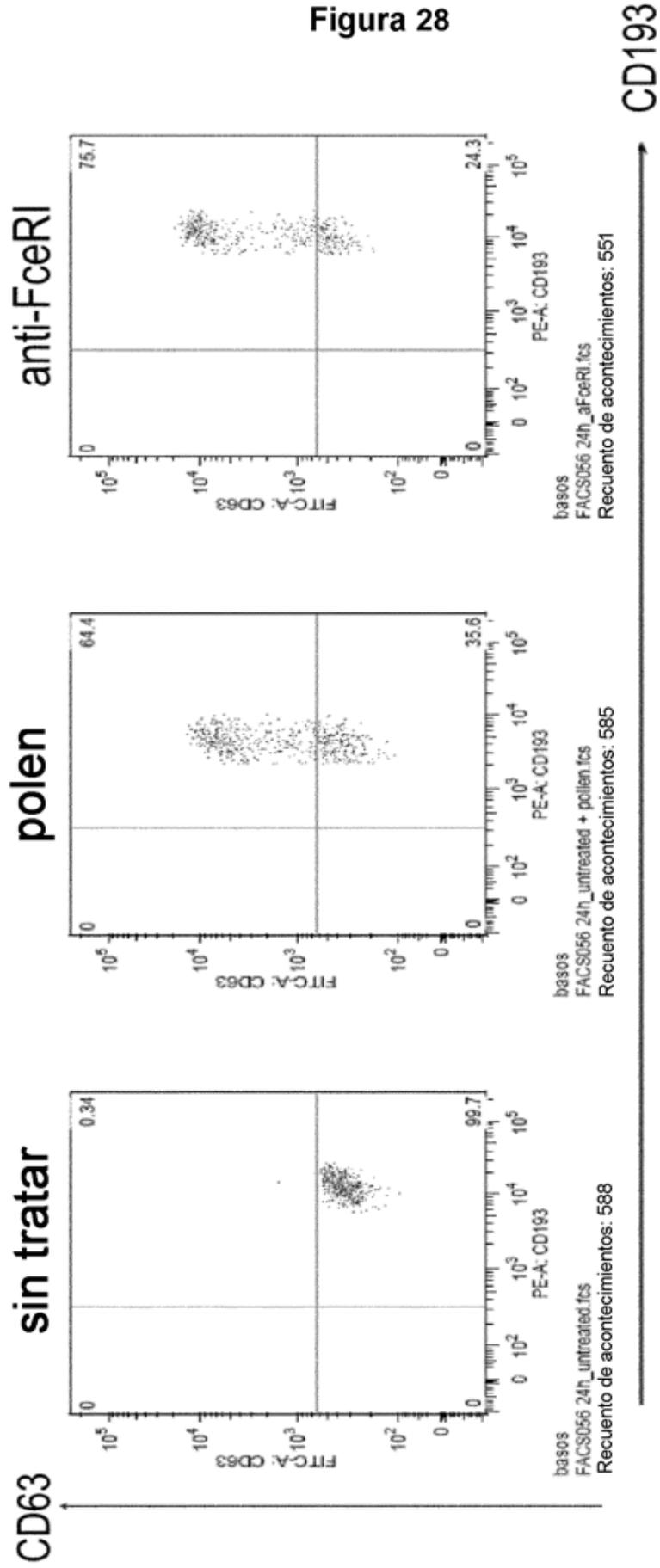


Figura 29

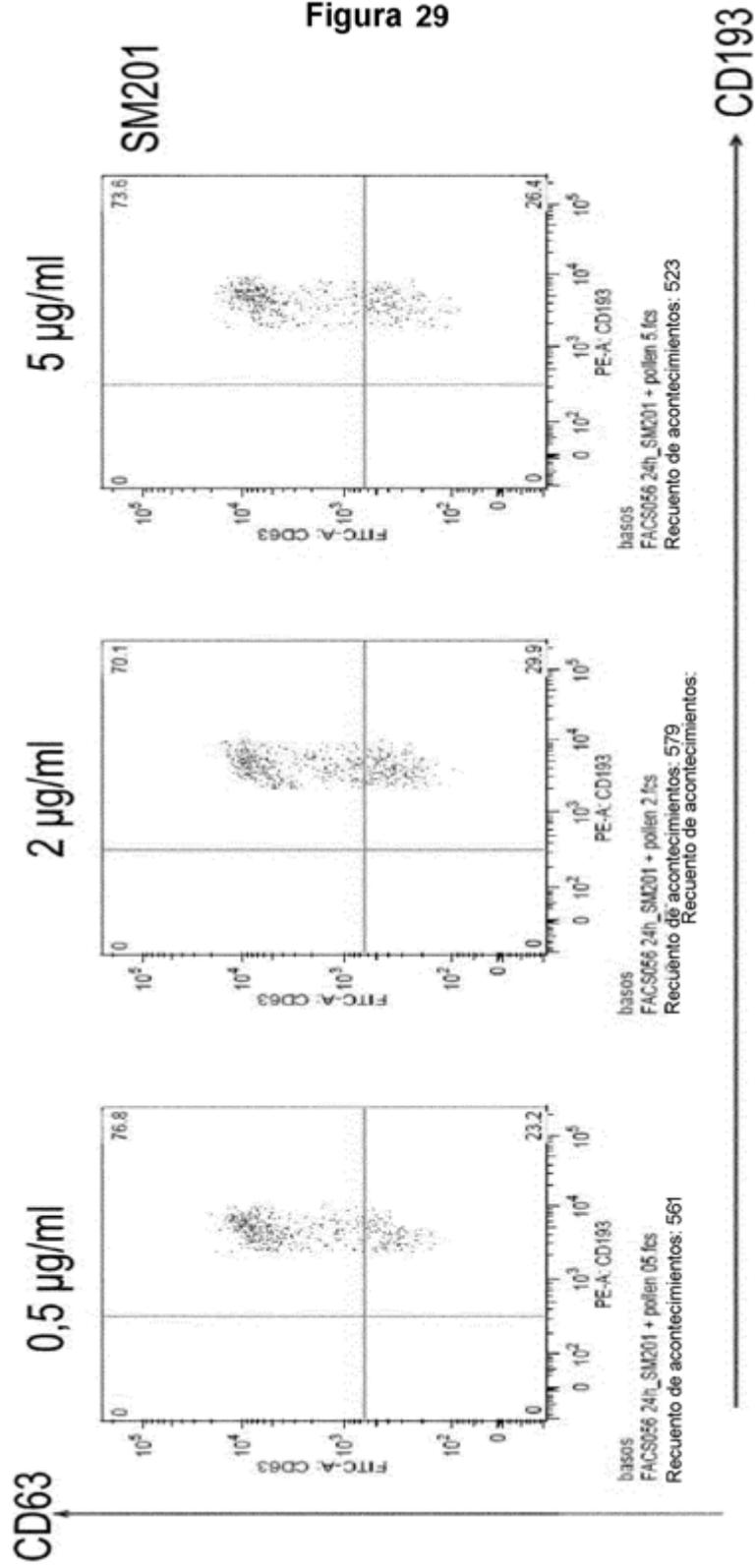


Figura 29 (cont.)

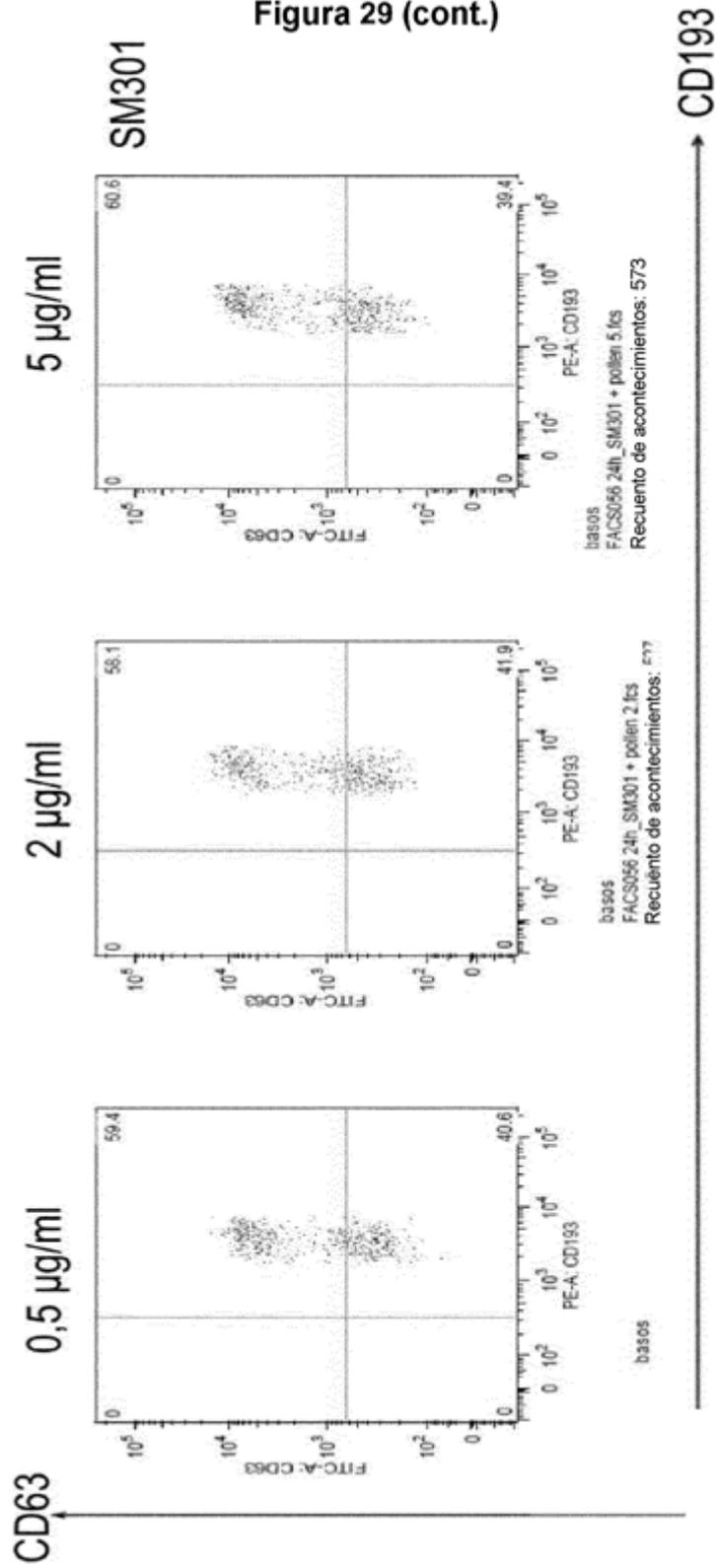


Figura 30

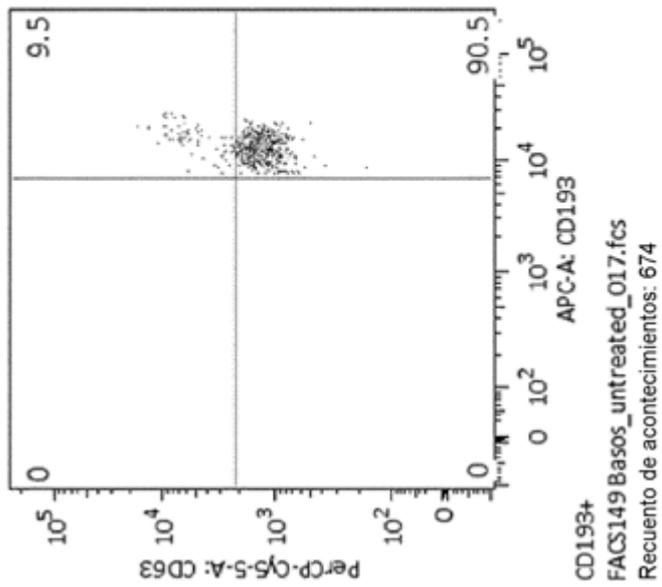
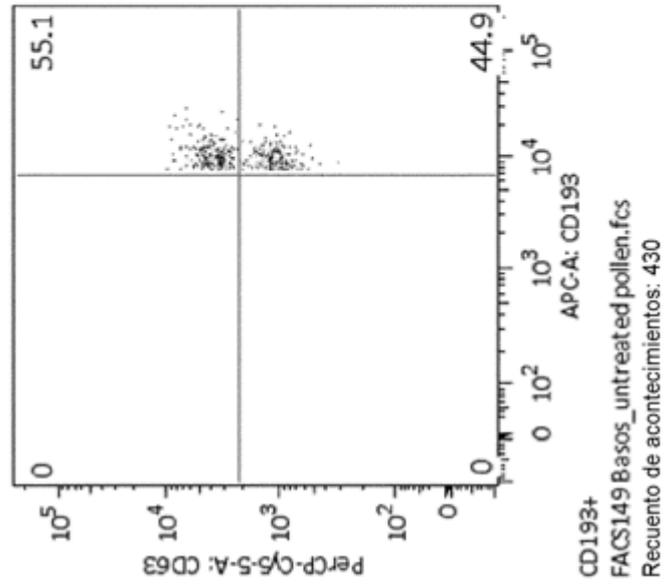
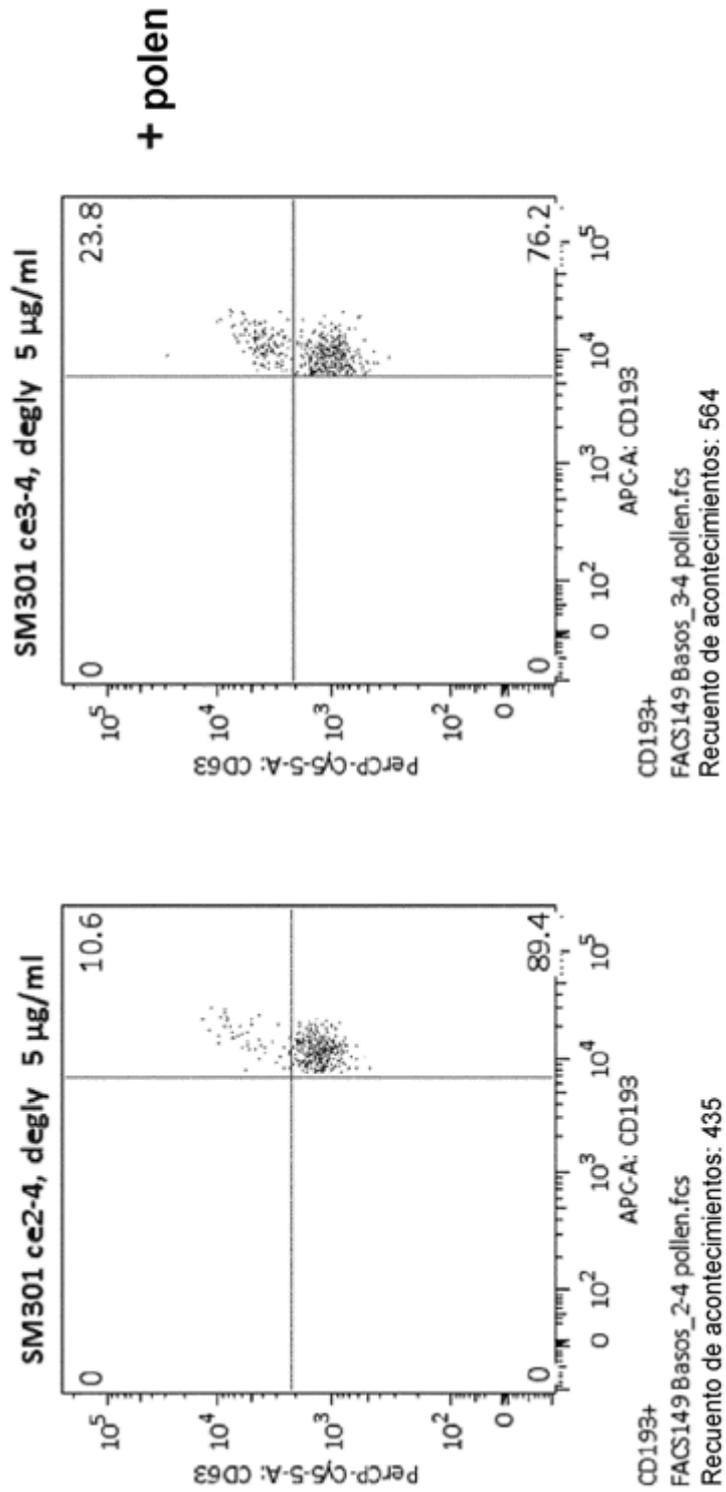


Figura 30 (cont.)



sin activación

Figura 30 (cont.)

