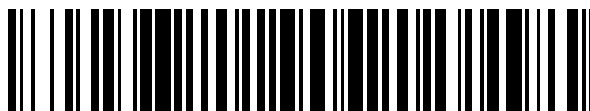


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 852**

51 Int. Cl.:

C07K 16/42 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2009 E 14188102 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.05.2016 EP 2853545**

54 Título: **Anticuerpo específico para IgE**

30 Prioridad:

17.09.2008 US 97819 P

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

16.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 589 852 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo específico para IgE

Campo técnico

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

Antecedentes de la invención

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

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

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

40 Debido a que la IgE juega un papel central en la mediación de la mayoría de las reacciones alérgicas, idear tratamientos para controlar los niveles de IgE en el cuerpo y regular la síntesis de IgE ha sido de gran interés. Se han propuesto varias estrategias para tratar las enfermedades alérgicas mediadas por IgE mediante la regulación por disminución de los niveles de IgE. Una estrategia implica neutralizar las moléculas de IgE mediante la unión de la cadena ε de IgE en el sitio de unión al receptor Fc, o cerca de este. Por ejemplo, Omalizumab (Xolair) es un anticuerpo anti-IgE monoclonal humanizado recombinante que se une a IgE en el mismo sitio Fc que FcεRI. 45 Omalizumab provoca una reducción en IgE circulante o en suero total en pacientes atópicos, que atenúa la cantidad de IgE específica del antígeno que se puede unir y sensibilizar los mastocitos y basófilos. Esto, a su vez, lleva a una reducción de los síntomas de enfermedades alérgicas. Cabe destacar que los niveles de IgE en suero aumentan después del comienzo de la terapia debido a la formación del complejo de omalizumab e IgE y pueden permanecer altos hasta un año después de detener la terapia. Por consiguiente, este problema puede llevar a falsos negativos en pruebas de diagnóstico y por lo tanto los niveles de IgE se deben verificar de forma rutinaria. Por consiguiente, existe una necesidad de mejores métodos y composiciones para reducir las enfermedades y los síntomas de enfermedades mediadas por IgE. 50

55 US6037453 describe dos clases de polipéptidos derivados de IgE humana. Wigginton et ál, Clin Exp Allergy, febrero 2008;38(2):313-9. La publicación electrónica del 7 de diciembre de 2007 describe que un anti-idiotipo G1 de inmunoglobulina humana quimérica reactiva a la inmunoglobulina E inhibe la desgranulación de basófilos mediante la reticulación de FcεRI con FcγRIIb. Chu et ál, Mol Immunol, setiembre de 2008;45(15):3926-33. La publicación electrónica del 8 de agosto de 2008 describe la inhibición de la activación mediada por receptores de células B de células B humanas principales por coadhesión de CD19 y FcγRIIb por anticuerpos modificados

genéticamente por Fc.

Compendio de ejemplos de realizaciones

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo que comprende:

- a) una cadena pesada con SEQ ID NO:42; y
- 5 b) una cadena ligera con SEQ ID NO:40.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición de ácido nucleico que comprende:

- a) un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada con SEQ ID NO:42; y
- b) un segundo ácido nucleico que codifica una cadena ligera con SEQ ID NO:40.

10 En un aspecto adicional, la invención proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir un anticuerpo que comprende:

- a) cultivar una célula hospedadora según la invención en condiciones en donde dicho anticuerpo se produce; y
- b) recuperar dicho anticuerpo.

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

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

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

De manera adecuada, la molécula de cohesión que coadhiere IgE y FcγRIIb con alta afinidad incluye una inmunoglobulina variante respecto de una inmunoglobulina original. De manera adecuada, la inmunoglobulina variante comprende una región Fc variante, en donde dicha región Fc variante comprende una o más (p. ej., dos o
45 más) modificaciones en comparación con una región Fc original, en donde dichas modificaciones están en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las
50 posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 266, 267, 268, 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, una o más modificaciones están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acuerdo con el índice EU.

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

De manera adecuada, dichas una o más modificaciones resultan en al menos una de las siguientes combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 239D/332E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU.

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

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

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

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

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

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

100 nM. Los métodos comprenden poner en contacto células IgE+ FcγRIIb+ con una molécula de coadhesión, en donde dicha molécula de coadhesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM.

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

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

10 La memoria descriptiva también describe usos terapéuticos y de diagnóstico para las moléculas de coadhesión descritas en la presente. De manera adecuada, las moléculas de coadhesión descritas en la presente se usan para tratar uno o más trastornos mediados por IgE, p. ej., enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, etc. que son mediadas por inmunoglobulina IgE. De manera adecuada, los trastornos alérgicos y atópicos que se pueden tratar con las composiciones descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, asma alérgica y atópica, dermatitis atópica y eczema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, choque anafiláctico y alergias a cualquier variedad de alergias ambientales o a los alimentos. Los métodos de tratamiento descritos en la presente comprenden la administración a un paciente que necesita tal administración de una cantidad terapéutica de una molécula de coadhesión que coadhiera IgE y FcγRIIb en la superficie celular.

20 Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

Figura 15. Inhibición de células B IgE+ de clase cambiada con anticuerpos anti-IgE variantes con mejor afinidad a FcγRIIb. La gráfica muestra la concentración de IgE liberado de PBMC después de 14 días de incubación con IL-4, anticuerpo agonista anti-CD40 (α-CD40), anticuerpo de reticulación BCR anti-CD79b y concentraciones variables de los anticuerpos mostrados. Los datos se normalizaron a la menor concentración de anticuerpo.

15

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

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

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

25

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

30

Figura 20. Niveles totales de IgG en suero del modelo in vivo huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23 y 37) reflejan las extracciones de sangre destacadas en el protocolo en la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab_IgG1 y los grupos 3 H1L1 MaE11 indican los grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una IgG1 WT (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE) o región Fc G236R/L328R (Fc-KO).

35

Figura 21. Niveles totales de IgE en suero del modelo in vivo huPBL-SCID para cada grupo de tratamiento. Los días indicados (7, 23 y 37) reflejan las extracciones de sangre destacadas en el protocolo en la Figura 19. PBS indica el grupo de vehículo no tratado, Omalizumab indica el grupo tratado con Omalizumab_IgG1 y los grupos 3 H1L1 MaE11 indican los grupos tratados con MaE11 humanizado que comprende una IgG1 WT (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE) o región Fc G236R/L328R (Fc-KO). El límite de cuantificación del método ELISA fue 31,6 ng/mL; las muestras que estaban debajo de este límite se informan como 31,6 ng/mL en la gráfica.

40

Descripción detallada de ejemplos de realizaciones

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

45

50

Las moléculas de cohesión de acuerdo con la descripción pueden adoptar una variedad de configuraciones como se describe en más detalle a continuación. De manera adecuada, la molécula de cohesión incluye una inmunoglobulina que une IgE y FcγRIIb con alta afinidad. En este caso, la inmunoglobulina preferentemente coadhiere IgE y FcγRIIb anclados a la membrana en la superficie de una célula y une con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de cohesión es una molécula biespecífica con una

55

- primera región específica objetivo y una segunda región específica objetivo, en donde la primera región específica objetivo une IgE y la segunda región específica objetivo une FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM, pese a que de manera adecuada, puede unir FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 10 nM o una Kd menor que aproximadamente 1 nM y en algunos casos puede unir con una Kd menor que 100 pM. De manera adecuada, la molécula de coadhesión es un anticuerpo biespecífico y la primera y segunda regiones específicas objetivo son regiones Fv, en donde la primera región Fv une IgE y la segunda región Fv une FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. De manera adecuada, la molécula de coadhesión es una fusión Fc que comprende una región Fc, en donde dicha región Fc une FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM. En este caso, el compañero de fusión Fc de la inmunoglobulina une IgE.
- 5
- 10 En la presente se describen varias definiciones. Se pretende que estas definiciones abarquen equivalentes gramaticales.
- “ADCC” o “citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos”, como se usa en la presente, se refiere a la reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, llevan a la lisis de la célula diana.
- 15 “ADCP” o fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpos, como se usa en la presente, se refiere a la reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, llevan a la fagocitosis de la célula diana.
- “Modificación de aminoácidos” en la presente se refiere a una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácido en una secuencia de polipéptidos. “Sustitución de aminoácido” o “sustitución” en la presente se refiere al remplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución S267E se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de cadena pesada constante, en donde la serina en la posición 267 es remplazada por ácido glutámico. “Inserción de aminoácido” o “inserción”, como se usa en la presente, se refiere a la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original. “Eliminación de aminoácido” o “eliminación”, como se usa en la presente, se refiere a la remoción de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos original.
- 20
- 25
- “Anticuerpo” en la presente se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por todos o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en seres humanos, incluyen la cadena kappa (κ), lambda (λ) y loci genéticos de cadena pesada, que juntos comprenden los innumerables genes de región variable y los genes de región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ) y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. En la presente, anticuerpo incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado genéticamente o un anticuerpo generado recombinantemente con fines experimentales, terapéuticos u otros.
- 30
- “Aminoácido” e “identidad de aminoácido”, como se usan en la presente, se refieren a uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquier análogo no natural que puede estar presente en una posición definida específica.
- 35
- “Célula CD32b+” o “célula FcγRIIb+”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula o tipo celular que expresa CD32b (FcγRIIb). Las células CD32b+ incluyen, pero no se limitan a, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos o eosinófilos.
- “Célula IgE+”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier célula o tipo celular que expresa IgE. En realizaciones preferidas de la invención, las células IgE+ expresan IgE anclada a la membrana (mIgE). Las células IgE+ incluyen, pero no se limitan a, células B y células plasmáticas.
- 40
- “CDC” o “citotoxicidad dependiente del complemento”, como se usa en la presente, se refiere a la reacción en la cual uno o más componentes de proteína de complemento reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y, de esta forma, llevan a la lisis de la célula diana.
- 45
- “Molécula de coadhesión” o equivalentes gramaticales se refieren a una molécula bifuncional capaz de unir IgE y FcγRIIb en donde la Kd de la unión de la molécula a FcγRIIb es menor que aproximadamente 100 nM en una superficie celular que resulta en la unión simultánea de IgE y FcγRIIb.
- “Región constante” de un anticuerpo como se define en la presente se refiere a la región del anticuerpo codificada por uno de los genes de región constante de inmunoglobulina de cadena ligera o pesada. “Cadena ligera constante” o “región constante de cadena ligera”, como se usa en la presente, se refiere a la región de un anticuerpo codificada por las cadenas ligeras kappa (Cκ) o lambda (Cλ). La cadena ligera constante típicamente comprende un único dominio y como se define en la presente se refiere a las posiciones 108-214 de Cκ o Cλ, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU. “Cadena pesada constante” o “región constante de cadena pesada” como se usa en la presente se refiere a la región de un anticuerpo codificada por los genes mu, delta, gamma, alfa o épsilon para definir el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA o IgE, respectivamente. Para los anticuerpos IgG de longitud completa, la cadena pesada constante, como se define en la presente, se refiere al extremo N del dominio CH1 al extremo C del dominio CH3, que comprende así las posiciones 118-447, en donde la numeración es de acuerdo con
- 50
- 55

el índice EU.

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

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

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

15 “Fc” o “región Fc”, como se usa en la presente, se refiere al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Por lo tanto, Fc se refiere a los últimos dos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD y IgG y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM y el extremo N de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cγ2 y Cγ3 (Cγ2 y Cγ3) y la bisagra entre Cγ1 (Cγ1) y Cγ2 (Cγ2). Pese a que los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define generalmente comprendiendo los residuos C226 o P230 a su extremo carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Fc se puede referir a esta región sola o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación.

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

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

30 “Receptor Fc gamma” o “FcγR”, como se usa en la presente, se refiere a cualquier miembro de la familia de proteínas que une la región Fc del anticuerpo IgG y está sustancialmente codificado por los genes FcγR. En los seres humanos esta familia incluye, pero no se limita a FcγRI (CD64), inclusive las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), inclusive las isoformas FcγRIIa (inclusive los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (inclusive FcγRIIb -1 y FcγRIIb -2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), inclusive las isoformas FcγRIIIa (inclusive los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (inclusive los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et ál., 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como cualquier FcγR humano no descubierto o isoformas o alotipos de FcγR. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, inclusive, de modo no taxativo, humanos, ratones, conejos y monos. FcγRs de ratón incluyen, pero no se limitan a FcγRI (GD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier FcγR de ratón no descubierto o isoformas o alotipos de FcγR.

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

55 “Anticuerpo de longitud completa”, como se usa en la presente, se refiere a la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo inclusive regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, inclusive seres humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, en donde cada par tiene una cadena ligera y

una cadena pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL y cada cadena pesada comprende dominios de inmunoglobulina VH, C γ 1, C γ 2 y C γ 3. En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en solo dos cadenas pesadas, en donde cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc.

- 5 "Inmunoglobulina" en la presente se refiere a una proteína que comprende uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos (inclusive anticuerpos biespecíficos) y fusiones Fc. Las inmunoglobulinas pueden tener una cantidad de formas estructurales que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y dominios de inmunoglobulina individual.
- 10 "Dominio de inmunoglobulina (Ig)", como se usa en la presente, se refiere a una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural diferente como lo determinará un experto en la técnica de estructura de proteína. Los dominios de Ig típicamente tienen una topología de plegado tipo β -sándwich. Los dominios de Ig conocidos en el isotipo IgG de anticuerpos son VH C γ 1, C γ 2, C γ 3, VL, y CL.
- 15 "IgG" o "inmunoglobulina IgG" o "inmunoglobulina G", como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que se codifican sustancialmente por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En los seres humanos esta clase comprende las subclases o isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
- 20 "IgE" o "inmunoglobulina IgE" o "inmunoglobulina E", como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que se codifican sustancialmente por un gen de inmunoglobulina épsilon reconocido. IgE puede estar anclada a la membrana (mIgE) o no anclada a la membrana, también denominada en la presente IgE circulante.
- "Inhibición" de células o equivalentes gramaticales se refiere a evitar o reducir la activación, proliferación, maduración o diferenciación de células dirigidas.
- 25 "Isotipo", como se usa en la presente, se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE.
- "Modificación" en la presente se refiere a una alteración en las propiedades físicas, químicas o de secuencia de una proteína, polipéptido, anticuerpo o inmunoglobulina. Las modificaciones descritas en la presente incluyen modificaciones de aminoácido y modificaciones de glicofoma.
- 30 "Modificación de glicofoma" o "glicofoma modificada" o "glicofoma modificada genéticamente", como se usa en la presente, se refiere a una composición de carbohidratos que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo un anticuerpo, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de la proteína original. La glicofoma modificada se refiere típicamente al carbohidrato u oligosacárido diferente; por lo tanto, por ejemplo, una variante Fc puede comprender una glicofoma modificada. De manera alternativa, glicofoma modificada se puede referir a la variante Fc que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente.
- 35 "Polipéptido original", "proteína original", "inmunoglobulina original", "polipéptido precursor", "proteína precursora" o "inmunoglobulina precursora", como se usa en la presente se refiere a un polipéptido, proteína o inmunoglobulina no modificada que se modifica posteriormente para generar una variante, p. ej., cualquier polipéptido, proteína o inmunoglobulina que sirve como plantilla y/o base para al menos una modificación de aminoácido descrita en la presente. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o versión modificada genéticamente de un polipéptido de origen natural. Polipéptido de origen natural puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido original o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, "polipéptido Fc original" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido Fc que se modifica para generar un polipéptido Fc variante y por "anticuerpo variante" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante (p. ej., un anticuerpo original puede incluir, pero no se limita a, una proteína que comprende la región constante de una Ig de origen natural).
- 45 "Posición" como se usa en la presente se refiere a una ubicación en la secuencia de una proteína. Las posiciones se pueden enumerar secuencialmente o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice de EU como se describe en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en la IgG1 de anticuerpo humano.
- 50 "Polipéptido" o "proteína", como se usa en la presente, significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos.
- "Residuo" como se usa en la presente se refiere a una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, Asparagina 297 (también denominada Asn297, también denominada N297) es un residuo en la IgG1 de anticuerpo humano.
- 55 "Antígeno diana" como se usa en la presente se refiere a la molécula que está unida por la región variable de un anticuerpo dado o el compañero de fusión de una fusión Fc. Un antígeno diana puede ser una proteína,

carbohidrato, lípido u otro compuesto químico. Se dice que un anticuerpo o fusión Fc es “específico” de un antígeno diana dado en función de que tiene afinidad por el antígeno diana.

“Célula diana” como se usa en la presente se refiere a una célula que expresa un antígeno diana.

5 “Región variable”, como se usa en la presente, se refiere a la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes V_K, V_λ y/o V_H que constituyen los locus genéticos de inmunoglobulina de cadena kappa, lambda y pesada respectivamente.

10 “Polipéptido variante”, “variante de polipéptido” o “variante” como se usa en la presente se refiere a una secuencia de polipéptidos que difiere de la de una secuencia de polipéptido original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido original puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (WT) o puede ser versión modificada de un polipéptido WT. Polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido o a la secuencia de amino que lo codifica. De manera adecuada, los polipéptidos variantes descritos en la presente (p. ej., inmunoglobulinas variantes) pueden tener al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido original, p. ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc. en comparación con el original. La secuencia de polipéptido variante en la presente puede poseer al menos aproximadamente 80% de homología con una secuencia de polipéptido original, p. ej., al menos aproximadamente 90% de homología, 95% de homología, etc. Por consiguiente, “variante Fc” o “Fc variante” como se usa en la presente se refiere a una secuencia Fc que difiere de la de una secuencia Fc original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Una variante Fc puede solo abarcar una región Fc o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión Fc, Fc aislado, fragmento Fc u otro polipéptido que es sustancialmente codificado por Fc. Variante Fc puede referirse al polipéptido Fc en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. “Variante de polipéptido Fc” o “polipéptido Fc variante”, como se usa en la presente, se refiere a un polipéptido Fc que difiere de un polipéptido Fc original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. “Variante de proteína” o “proteína variante”, como se usa en la presente, se refiere a una proteína que difiere de una proteína original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. “Variante de anticuerpo” o “anticuerpo variante”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que difiere de un anticuerpo original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. “Variante de IgG” o “IgG variante”, como se usa en la presente, se refiere a un anticuerpo que difiere de una IgG original en virtud de al menos una modificación de aminoácido. “Variante de inmunoglobulina” o “inmunoglobulina variante” como se usa en la presente se refiere a una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la de una secuencia de inmunoglobulina original en virtud de al menos una modificación de aminoácido.

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

Moléculas de cohesión

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

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

60

molécula de cohesión a un antígeno diana, como IgE. De manera adecuada, la molécula de cohesión puede comprender FcεRI o FcεRII/CD23 como un compañero de fusión. De manera adecuada, las inmunoglobulinas son útiles como moléculas de cohesión.

Inmunoglobulinas

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

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

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

20 Cada una de las cadenas ligera y pesada está hecha de dos regiones distintas, denominadas regiones variable y constante. La cadena pesada de IgG está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina enlazados desde el extremo N al C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, que se refiere al dominio variable de cadena pesada, dominio constante de cadena pesada 1, dominio constante de cadena pesada 2 y dominio constante de cadena pesada 3, respectivamente (también denominada VH-Cγ1-Cγ2-Cγ3, que se refiere al dominio variable de cadena, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2 y dominio constante gamma 3 respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta de dos dominios de inmunoglobulina enlazados del extremo N al C en el orden VL-CL, que se refiere al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia y son responsables por la unión de una cantidad de proteínas naturales para provocar eventos bioquímicos importantes. Los rasgos distintivos entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, pese a que pueden existir diferencias más sutiles en la región variable.

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

30 La parte carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. En la presente, "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria diferente. De interés en las realizaciones descritas en la presente son los dominios de cadena

pesada que incluyen los dominios de cadena constante (CH) y la región bisagra. En el contexto de anticuerpos IgG, los isotipos IgG tienen tres regiones CH cada uno. Por consiguiente, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

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

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

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

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

Un sitio que se superpone pero separado en Fc sirve como la interface para la proteína de complemento C1q. Del mismo modo que la unión a Fc/FcγR media ADCC, la unión a Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cγ2 y Cγ3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión del cual recicla anticuerpos endocitosados desde el endosoma nuevamente hacia el flujo sanguíneo (Raghavan et ál., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et ál., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766). Este proceso, acoplado con la exclusión de filtración del riñón debido al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado semividas en suero del anticuerpo favorables que oscilan de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también cumple un rol clave en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión de FcRn en Fc es también el sitio en el que las proteínas bacterianas A y G se unen. La unión estrecha por estas proteínas es típicamente explotada como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad a proteína A o proteína G durante la protección de proteínas. La fidelidad de estas regiones, las regiones de complemento y de unión FcRn/proteína A son importantes tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos y su desarrollo.

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

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

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

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

pueden ser útiles como enlazadores, es decir, pueden ser útiles para enlazar una región Fc a un compañero de fusión.

También se contemplan como compañeros de fusión los polipéptidos Fc. Por lo tanto, una inmunoglobulina como se describe en la presente puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende dos o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión a los receptores Fc con una molécula de proteína única. De manera adecuada, las regiones Fc se pueden enlazar usando un enfoque de ingeniería química. Por ejemplo, las Fab y Fc se pueden enlazar por enlaces tioéter que se originan en residuos de cisteína en las bisagras, generando moléculas como FabFc₂.

Las regiones Fc se pueden enlazar usando ingeniería de disulfuro y/o reticulación química. De manera adecuada, las regiones Fc pueden enlazarse genéticamente. De manera adecuada, las regiones Fc en una inmunoglobulina se enlazan genéticamente a regiones Fc generadas enlazadas en tándem como se describe en USSN 11/022,289 (US2005-0249723 A1), presentado el 21/12/2004, con el título "Fc polypeptides with novel Fc ligand binding sites,". Los polipéptidos Fc enlazados en tándem pueden comprender dos o más regiones Fc, p. ej., una a tres regiones Fc, dos regiones Fc. Puede ser ventajoso explorar una cantidad de construcciones genéticamente modificadas para obtener regiones Fc enlazadas en homo- o hetero-tándems con las propiedades funcionales y estructuras más favorables. Las regiones Fc enlazadas en tándem puede ser regiones Fc enlazadas por homo-tándem, es decir una región Fc de un isotipo se fusiona genéticamente a otra región Fc del mismo isotipo. Se anticipa que debido a que hay múltiples sitios de unión a FcγR, C1q y/o FcRn en polipéptidos Fc enlazados en tándem, las funciones efectoras y/o farmacocinética se pueden mejorar. De manera adecuada, las regiones Fc de diferentes isotipos se pueden enlazar en tándem, denominadas en la presente regiones Fc enlazadas en hetero-tándem. Por ejemplo, debido a que la capacidad de dirigirse a receptores FcγR y FcαRI, una inmunoglobulina que se une a FcγR y FcαRI puede proporcionar una mejora clínica considerable.

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

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

Como se sabe en la técnica, los polimorfismos de inmunoglobulinas existen en la población humana. Los polimorfismos Gm se determinan por los genesIGHG1, IGHG2 e IGHG3 que tienen alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos denominados G1m, G2m y G3m para marcadores de las moléculas de IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se encontraron alotipos Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores se pueden clasificar en "alotipos" e "isoalotipos". Estos se distinguen en diferentes bases serológicas dependiendo de la fuerte homología de secuencia entre los isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicas especificados por formas alélicas de los genes Ig. Los alotipos representan leves diferencias en las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada o ligera de diferentes individuos. Incluso una diferencia de un solo aminoácido puede dar lugar a una determinante alotípica, pese a que en muchos casos ocurrieron sustituciones de varios aminoácidos. Los alotipos son diferencias de secuencia entre alelos de una subclase por las cuales el antisuero reconoce solo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que se comparte con una región homóloga no polimórfica de uno o más isotipos diferentes y debido a esto el antisuero reaccionará tanto con los alotipos relevantes como con los isotipos homólogos relevantes (Clark, 1997, IgG effector mechanisms, Chem Immunol. 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, Semin Immunol 2(6):457-66).

Las formas alélicas de inmunoglobulinas humanas se han caracterizado bien (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem Evan, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51). Además, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim et ál., 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9). Actualmente se conocen 18 alotipos G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et ál., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et ál., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211). Los alotipos que se injertan en combinaciones fijas se denominan haplotipos Gm. Las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden

codificar sustancialmente por un alotipo, isoalotipo o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden componer un polipéptido Fc que incluye, pero no se limita a anticuerpos, Fc aisladas, fragmentos de Fc y fusiones Fc. En una realización, una inmunoglobulina descrita en la presente es un anticuerpo de longitud completa que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo inclusive regiones variables y constantes. Para el isotipo IgG, el anticuerpo de longitud completa es un tetrámero y consiste en dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulinas, en donde cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada, cada cadena ligera comprende dominios de inmunoglobulina VL y CL y cada cadena pesada comprende dominios de inmunoglobulina VH, C γ 1, C γ 2 y C γ 3. En otro caso, las inmunoglobulinas descritas en la presente son regiones Fc aisladas o fragmentos de Fc.

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

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, de modo no taxativo, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo simple; (iv) el fragmento dAb que consiste en una variable única, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena simple (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL se unen por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros Fc de cadena simple biespecíficos y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por fusión genética. Los fragmentos de anticuerpo pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse con la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL. Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos se describen en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-357 y las referencias citadas allí.

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

Anticuerpos no humanos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos

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

"Anticuerpos humanizados" se refieren generalmente a anticuerpos no humanos a los que se les intercambiaron las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo total, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, algunas o todas las cuales están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de láminas beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad se determina por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe en, p. ej., WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536. La "retromutación" de residuos marco de aceptor seleccionados a los residuos de donante correspondientes se requiere frecuentemente para volver a ganar afinidad perdida en la construcción que se injertó inicialmente (patente estadounidense n.º 5,693,762. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana y por lo tanto típicamente comprenderá una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados pueden también generarse usando ratones con un sistema inmunitario modificado genéticamente. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos se conocen en la técnica (Véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (EUA) y las referencias citadas allí). La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de

anticuerpo no humano pueden incluir métodos de revestimiento como se describe, por ejemplo en Roguska et ál., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 91:969-973. En una realización, el anticuerpo original se maduró por afinidad, como se conoce en la técnica. Los métodos basados en la estructura se pueden emplear para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en la serie estadounidense n.º 11/004,590 (US 2006-0008883 A1). Los métodos basados en selección se pueden utilizar para humanizar y/o madurar por afinidad las regiones variables de anticuerpos, es decir, para aumentar la afinidad de la región variable por su antígeno diana. Otros métodos de humanización pueden implicar injertar solo partes de las CDR inclusive, pero sin limitarse a, métodos descritos en USSN 09/810,502 (US 2002-0034765 A1); Tan et ál., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et ál., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084. Los métodos basados en la estructura se pueden emplear para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 10/153,159 (US 2002-0177170 A1) y en solicitudes relacionadas. En determinadas variaciones, la inmunogenicidad del anticuerpo se reduce usando un método descrito en Lazar et ál., 2007, Mol Immunol 44:1986-1998 y USSN 11/004,590 (US 2006-0008883 A1), con el título "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof", presentada el 3 de diciembre de 2004.

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano con al menos una modificación como se destaca en la presente. "Anticuerpo totalmente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia de genes de un anticuerpo que deriva de un cromosoma humano con las modificaciones como se describen en la presente. Los anticuerpos totalmente humanos se pueden obtener, por ejemplo, usando ratones transgénicos (Bruggemann et ál., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección (Griffiths et ál., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108). En una realización, los anticuerpos equivalentes humanos se pueden generar por computadora como se describe en PCT/US09/41144 (W02009/129538 A2).

Anticuerpos anti-IgE

Las inmunoglobulinas descritas en la presente se unen a IgE. Los anticuerpos anti-IgE de la invención pueden comprender cualquier región variable, conocida o aun no conocida, que tiene especificidad por IgE. Los anticuerpos anti-IgE incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos murinos MaE11, MaE13 y MaE15, versiones humanizadas y/o modificadas genéticamente de estos anticuerpos inclusive E25, E26 y E27, particularmente E25, también conocido como rhuMab-E25, también conocido como Omalizumab, tal como los descritos en US6761889, US6329509, US20080003218A1, y Presta, LG et ál., 1993, J Immunol 151:2623-2632. Una versión modificada genéticamente preferida de MaE11 es MaE11 H1L1, descrita en los Ejemplos de la presente. Otros anti-IgE que pueden ser útiles para la invención incluyen anticuerpo murino TES-C21, quimérico TES-C21, también conocido como CGP51901 (Corne, J et ál., 1997, J Clin Invest 99:879-887; Racine-Poon, A et ál., 1997, Clin Pharmacol Ther 62:675-690) y versiones humanizadas y/o modificadas genéticamente de este anticuerpo que incluyen, pero no se limitan a CGP56901, también conocido como TNX-901, tal como los anticuerpos descritos en Kolbinger, F et ál., 1993, Protein Eng 6:971-980. Otros anticuerpos anti-IgE que pueden ser útiles en la invención se describen en US6066718, US6072035, PCT/US04/02894 (W02004/070011 A2), US5342924, US5091313, US5449760, US5543144, US5342924 y US5614611. Otros anticuerpos anti-IgE útiles incluyen el anticuerpo murino BSW17. Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de región variable y CDR de algunos de estos anticuerpos se proporcionan en la Figura 5.

Variantes Fc y propiedades de unión al receptor Fc

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

Las variantes Fc descritas en la presente se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácido que las componen. Por lo tanto, por ejemplo, S267E es una variante Fc con la sustitución S267E respecto del polipéptido Fc original. Asimismo, S267E/L328F define una variante Fc con la sustitución S267E y L328F respecto del polipéptido Fc original. La identidad del aminoácido WT puede ser inespecífica, en cuyo caso la variante antes mencionada es

denominará 267E/328F. Cabe destacar que el orden en el que las sustituciones se proporcionan es arbitrario, es decir, por ejemplo, 267E/328F es la misma variante Fc que 328F/267E y así sucesivamente. A menos que se indique otra cosa, las posiciones descritas en la presente se enumeran de acuerdo con el índice EU o esquema de numeración EU (Kabat et ál., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice EU o índice EU como en Kabat o esquema de numeración EU se refiere a la enumeración del anticuerpo EU (Edelman et ál., 1969, Proc Natl Acad Sci EUA 63:78-85);

De manera adecuada, las variantes Fc descritas en la presente se basan en secuencias IgG humanas y por lo tanto las secuencias IgG humanas se usan como las secuencias "base" contra las cuales se comparan las otras secuencias que incluyen, pero no se limitan a secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedores y primates. Las inmunoglobulinas también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulinas como IgA, IgE, IgGD, IgGM, y similares. Se contempla que, pese a que las variantes Fc descritas en la presente se modifican genéticamente en el contexto de una IgG original, las variantes se pueden modificar genéticamente o "transferirse" al contexto de la otra, segunda IgG original. Esto se hace determinando los residuos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda IgG, típicamente en función de homología de secuencia o estructural entre las secuencias de la primera y segunda IgG. Para establecer homología, la secuencia de aminoácidos de la primera IgG descrita en la presente se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineación de homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando residuos conservados como entre especies), permitiendo inserciones y eliminaciones necesarias para mantener la alineación (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados a través de eliminación e inserción arbitraria), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia principal de la primera inmunoglobulina. La alineación de residuos conservados puede conservar 100% de estos residuos. Sin embargo, la alineación de más de 75% o como mínimo 50% de residuos conservados también es adecuada para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también se pueden definir determinando homología estructural entre una primera y segunda IgG que está a nivel de una estructura terciaria de IgG cuyas estructuras se determinaron. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de cadena principal de un residuo de aminoácido particular del original o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de aproximadamente 0,13 nm, después de la alineación. De manera adecuada, los residuos equivalentes están dentro de aproximadamente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se logra después de orientar y posicionar el mejor modelo para dar la superposición máxima de coordenadas atómicas de átomos de proteína no hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG original en que se hacen las IgG, lo que se pretende comunicar es que las variantes Fc descubiertas como descritas en la presente se pueden modificar genéticamente en cualquier segunda IgG original que tiene homología estructural o de secuencia significativa con la variante Fc. Por lo tanto, por ejemplo, si un anticuerpo variante se genera en donde el anticuerpo original es IgG1 de humano, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede modificarse genéticamente en otro anticuerpo original IgG1 que se une a un antígeno diferente, un anticuerpo original IgG2 humano, un anticuerpo original IgA humano, un anticuerpo original IgG2a o IgG2b de ratón y similares. Nuevamente, como se describe anteriormente, el contexto de la variante Fc original no afecta la capacidad de transferir las variantes Fc descritas en la presente a otros IgG originales.

Las variantes Fc descritas en la presente pueden optimizarse para una variedad de propiedades de unión al receptor de Fc. Una variante Fc que se modifica genéticamente o que se predice que muestra una o más propiedades optimizadas se denomina en la presente "variante Fc optimizada". Las propiedades que se pueden optimizar incluyen, pero no se limitan a, mejor o menor afinidad por un FcγR. De manera adecuada, las variantes Fc descritas en la presente se optimizan por poseer una mejor afinidad por un FcγRIIb receptor inhibidor. En otro caso, las inmunoglobulinas descritas en la presente proporcionan mejor afinidad por FcγRIIb, pero menor afinidad por uno o más FcγRs de activación, inclusive, por ejemplo, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa y/o FcγRIIIb. Los receptores FcγR se pueden expresar en células de cualquier organismo inclusive, pero sin limitarse a, seres humanos, monos, cerdos y ratones. Las variantes Fc descritas en la presente se pueden optimizar para poseer una mejor afinidad por FcγRIIb humano.

"Mayor afinidad" o "afinidad mejorada" o "afinidad potenciada" o "mejor afinidad" que un polipéptido Fc original, como se usa en la presente se refiere a que una variante Fc se une a un receptor Fc con una constante de asociación de equilibrio significativamente mayor (K_A o K_a) o constante de disociación de menor equilibrio (K_D o K_d) que el polipéptido Fc original cuando las cantidades de polipéptido variante y original en el ensayo de unión son esencialmente las mismas. Por ejemplo, la variante Fc con mejor afinidad de unión al receptor Fc puede mostrar una mejora de aproximadamente 5 veces a aproximadamente 1000 veces, p. ej., de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 500 veces en la afinidad de unión al receptor Fc en comparación con el polipéptido Fc original, en donde la afinidad de unión del receptor Fc se determina, por ejemplo, por métodos de unión descritos en la presente que incluyen, pero no se limitan a, Biacore, por un experto en la técnica. Por consiguiente, "menor afinidad" en comparación con un polipéptido Fc original como se usa en la presente se refiere a que una variante Fc se une a un receptor Fc con una K_A significativamente menor o una K_D mayor que el polipéptido Fc original. Mayor o menor afinidad también se puede definir respecto de un nivel absoluto de afinidad. Por ejemplo, según los datos de la

presente, IgG1 WT (natural) se une a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 2 μM, o aproximadamente 2000 nM. Además, algunas variantes Fc descritas en la presente se unen a FcγRIIb con una afinidad de aproximadamente 10 veces más a IgG1 WT. Como se describe en la presente, una afinidad mayor o mejorada se refiere a una K_D menor que aproximadamente 100 nM, por ejemplo entre aproximadamente 10 nM -

5 aproximadamente 100 nM, entre aproximadamente 1 - aproximadamente 100 nM, o menos que aproximadamente 1 nM.

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

10 De manera adecuada, las variantes Fc proporcionan una afinidad selectivamente mejorada a FcγRIIb respecto de uno o más receptores de activación. Afinidad selectivamente mejorada significa que la variante Fc tiene mejor afinidad por FcγRIIb respecto de uno o más receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc original pero tiene afinidad reducida por uno o más receptores de activación en comparación con el polipéptido Fc original, o significa que la variante Fc tiene mejor afinidad tanto por FcγRIIb y uno o más receptores de activación en

15 comparación con el polipéptido Fc original, sin embargo, la mejora en la afinidad es mayor para FcγRIIb que lo es para uno o más receptores de activación. De manera adecuada, variantes Fc reducen o eliminan la unión a uno o más FcγRs de activación, reducen o eliminan la unión a una o más proteínas de complemento, reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por FcγR y/o reducen o eliminan una o más funciones efectoras mediadas por complemento.

20 La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγRs proporciona aun otro parámetro que impacta en la utilidad terapéutica de las variantes Fc descritas en la presente. Mientras que la especificidad y selectividad de una variante Fc dada por las diferentes clases de FcγRs afecta significativamente la capacidad de una variante Fc de dirigirse a un antígeno dado por tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o selectividad de una variante Fc por diferentes formas polimórficas de estos receptores puede determinar en parte qué investigación o experimentos

25 preclínicos pueden ser apropiados para evaluar y en última instancia qué poblaciones de pacientes pueden o no responder al tratamiento. Por lo tanto, la especificidad o selectividad de variantes Fc descritas en la presente a polimorfismos del receptor de Fc incluyendo, pero sin limitarse a, FcγRIIa, FcγRIIa, y similares, se pueden usar para guiar la selección de investigación válida y experimentos preclínicos, diseño de ensayo clínico, selección de paciente, dependencia de dosificación y/u otros aspectos relativos a los ensayos clínicos.

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

Un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante Fc dada para tratar una

35 enfermedad dada es el contexto de la variante Fc. Por lo tanto, la selectividad o especificidad de receptor Fc de una variante Fc dada proporcionará diferentes propiedades dependiendo de si compone un anticuerpo, fusión Fc o variantes Fc con un compañero de fusión acoplado. De manera adecuada, la especificidad de receptor Fc de la variante Fc descrita en la presente determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante Fc dada a efectos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno diana y la enfermedad o indicación que se está tratando.

40 Para algunas dianas e indicaciones, una mayor afinidad de FcγRIIb y una función efectora mediada por FcγR de activación reducida puede ser beneficiosa. Para otros antígenos diana y aplicaciones terapéuticas, puede ser beneficioso aumentar la afinidad por FcγRIIb o aumentar la afinidad por FcγRIIb y receptores de activación.

Medios para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE

En la presente se describen medios para alterar la afinidad a uno o más FcγRs. En un caso preferido, la afinidad se altera al receptor inhibitor FcγRIIb, alterando así la capacidad de la inmunoglobulina de mediar una o más funciones efectoras de inhibición mediadas por FcγRIIb. Los medios incluyen modificaciones de aminoácidos (p. ej., medios de posición para optimizar la función, medios de sustitución para optimizar la función, etc.) y modificaciones de glicofoma (p. ej., medios para modificaciones de glicofoma).

45

Modificaciones de aminoácidos

50 En la presente se describen inmunoglobulinas que comprenden modificaciones de aminoácidos, en donde dichas modificaciones alteran la afinidad a uno o más FcγRs. Preferentemente, dichas modificaciones de aminoácidos mejoran la afinidad a FcγRIIb. Sin embargo, en algunos casos, las modificaciones pueden mejorar la afinidad a uno o más receptores de activación, por ejemplo FcγRI, FcγRIIa y FcγRIIa. Las modificaciones para alterar la unión a FcγRs se describen en USSN 11/124,620 (US2006-0024298 A1), presentada el 5 de mayo de 2005, con el título

55 "Optimized Fc Variants" y USSN 12/156,183 (US2009-0136485 A1), presentada el 30 de mayo de 2008, con el título "Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing Cells".

Como se describe en la presente, los medios de posición para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE incluyen, pero no se limitan a, modificación de un aminoácido en una o más posiciones de región constante de

cadena pesada (p. ej., en posiciones: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332) que permiten la modificación de las propiedades de unión de inmunoglobulina Fc γ R11b, función efectora, y propiedades potencialmente clínicas de anticuerpos.

5 En particular, los medios de sustitución para optimizar la actividad de anticuerpos anti-IgE, p. ej., alterando la afinidad a Fc γ R11b incluyen, pero no se limitan a, una sustitución de un aminoácido en una o más posiciones de región constante de cadena pesada, p. ej., una o más de las sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones de región constante de cadena pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, los medios de sustitución incluyen al menos una (p. ej., dos o más) sustituciones en comparación con una región Fc original, en donde dichas modificaciones están en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, de acuerdo con el índice EU. De manera adecuada, los medios de sustitución incluyen una o más (p. ej., dos o más) sustituciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328, de acuerdo con el índice EU.

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

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

De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan en al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones: 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 268D/327E, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E,

234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan en al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones: 266D, 234F/236N, 234F/236D, 236A/237A, 236S/237A, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235S/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E, donde la numeración es de acuerdo con un índice EU. De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan en al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones: 234N, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 237H, 237L, 239D, 239N, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 326A, 326E, 326W, 327D, 327L, 328E, 328F, 330D, 330H, 330K, 234F/236N, 234F/236D, 235D/239D, 234D/267E, 234E/267E, 234F/267E, 235D/267E, 235F/267E, 235T/267E, 235Y/267D, 235Y/267E, 236D/267E, 236E/267E, 236N/267E, 237D/267E, 237N/267E, 239D/267D, 239D/267E, 266M/267E, 234E/268D, 236D/268D, 239D/268D, 267D/268D, 267D/268E, 267E/268D, 267E/268E, 267E/325L, 267D/327D, 267D/327E, 267E/327D, 267E/327E, 268D/327D, 239D/328Y, 267E/328F, 267E/328H, 267E/328I, 267E/328Q, 267E/328Y, 268D/328Y, 239D/332E, 328Y/332E, 234D/236N/267E, 235Y/236D/267E, 234W/239E/267E, 235Y/239D/267E, 236D/239D/267E, 235Y/267E/268E, 236D/267E/268E, 239D/267E/268E, 234W/239D/328Y, 235F/239D/328Y, 234E/267E/328F, 235D/267E/328F, 235Y/267E/328F, 236D/267E/328F, 239D/267A/328Y, 239D/267E/328F, 234W/268D/328Y, 235F/268D/328Y, 239D/268D/328F, 239D/268D/328W, 239D/268D/328Y, 239D/268E/328Y, 267A/268D/328Y, 267E/268E/328F, 239D/326D/328Y, 268D/326D/328Y, 239D/327D/328Y, 268D/327D/328Y, 239D/267E/332E, 234W/328Y/332E, 235F/328Y/332E, 239D/328F/332E, 239D/328Y/332E, 267A/328Y/332E, 268D/328F/332E, 268D/328W/332E, 268D/328Y/332E, 268E/328Y/332E, 326D/328Y/332E, 327D/328Y/332E, 234W/236D/239E/267E, 239D/268D/328F/332E, 239D/268D/328W/332E y 239D/268D/328Y/332E.

De manera adecuada, dichos medios de sustitución resultan en al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F, en donde la numeración es de acuerdo con un índice EU.

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

Modificaciones de glicoforma

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

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

Los restos de carbohidrato de las inmunoglobulinas descritas en la presente se describirán respecto de la nomenclatura usada comúnmente para la descripción de oligosacáridos. Una revisión de la química e carbohidratos

que usa esta nomenclatura se encuentra en Hubbard et ál. 1981, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen por la notación resumida NeuNAc, para ácido 5-N-acetilneuramínico y NeuNGc para ácido 5-glicolilneuramínico.

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

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

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

25 Una variedad de métodos se conocen en la técnica para generar glicofomas modificadas (Umaña et ál., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et ál., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et ál., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et ál., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); (US 6,602,684; USSN 10/277,370 (US 2003-0157108); USSN 10/113,929 (US 2003-0003097 A1); PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); (tecnología Potelligent™ [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMab™ [biotecnología GLYCART AG, Zurich, Suiza]). Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo, mediante la expresión de una IgG en varios organismos o líneas celulares, modificados genéticamente o de otro modo (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células YB2/0 de hibridoma de rata), mediante la regulación de enzimas implicadas en la vía de glicosilación (por ejemplo, FUT8 [α1, 6-fucosiltransferasa] y/o [β1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]], o mediante la modificación del o los carbohidratos luego de que se expresó la IgG. Otros métodos para modificar glicofomas de las inmunoglobulinas descritas en la presente incluyen el uso de cepas modificadas genéticamente por glicosilación de levadura (Li et ál., 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), musgo (Nechansky et ál., 2007, Mol Immunol 44(7): 1826-8) y plantas (Cox et ál., 2006, Nat Biotechnol 24(12): 1591-7). El uso de un método particular para generar una glicofoma modificada no pretende restringir las realizaciones a ese método. Por el contrario, las realizaciones descritas en la presente abarcan variantes Fc con glicofomas modificadas independientemente de cómo se producen.

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

35 La glicofoma modificada genéticamente se refiere típicamente al carbohidrato u oligosacárido diferente; por lo tanto, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicofoma modificada genéticamente. De manera alternativa, glicofoma modificada genéticamente se puede referir a la inmunoglobulina que comprende el carbohidrato u oligosacárido diferente. De manera adecuada, una composición descrita en la presente comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, p. ej., 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc. del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene fucosa. De manera adecuada, el anticuerpo en la composición

comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene fucosa y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En un caso alternativo, una composición comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100% o 90-100% del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene ácido siálico. En otro caso, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que no tiene ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En aun otro caso, una composición comprende una variante Fc glicosilada que tiene una región Fc, en donde aproximadamente 51-100% del anticuerpo glicosilado, 80-100% o 90-100% del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato de núcleo madura que contiene ácido siálico. De manera adecuada, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato de núcleo madura que contiene ácido siálico y adicionalmente comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. De manera adecuada, las combinaciones de glicofoma modificada genéticamente y la modificación de aminoácido le proporciona propiedades óptimas de unión al receptor Fc al anticuerpo.

Otras modificaciones

Las inmunoglobulinas descritas en la presente pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no se relacionan específicamente con funciones efectoras mediadas por FcγR o complemento en sí mismas. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácido o pueden ser modificaciones que se hacen enzimática o químicamente. Estas modificaciones probablemente proporcionen algo de mejora en la inmunoglobulina, por ejemplo, una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. En la presente se describe una variedad de mejoras que se pueden hacer acoplando las inmunoglobulinas descritas en la presente con modificaciones adicionales.

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

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

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

amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal. Modificaciones adicionales también pueden incluir, pero no se limitan a, modificaciones posttraduccionales como glicosilación y fosforilación enlazada a N o enlazada a O.

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

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

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

30 De manera adecuada, las inmunoglobulinas descritas en la presente se pueden combinar con inmunoglobulinas que alteran la unión a FcRn. Estas variantes pueden proporcionar mejores propiedades farmacocinéticas a las inmunoglobulinas. Las variantes preferidas que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen pero no se limitan a sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, inclusive pero no limitado a, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M (PCT/US2008/088053 (W02009086320 A1), presentada el 22 de diciembre de 2008, con el título "Fc Variants with Alterned Binding to FcRn"). Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no se limitan a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et ál., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et ál. 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311 A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et ál., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et ál. Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et ál., 2006, The Journal of biological chemistry 281:23514- 23524).

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

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

55 Conjugados

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente son "proteínas de fusión" al anticuerpo, denominadas a veces en la presente "conjugados de anticuerpos". El compañero de fusión o compañero de conjugado puede ser proteináceo o no proteináceo; el último se genera generalmente usando grupos funcionales en el anticuerpo y en el compañero de conjugado. Los compañeros de conjugado y fusión pueden ser cualquier

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

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

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se fusionan o conjugan a una citocina. "Citocina", como se usa en la presente, es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa en otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et ál., 2001, J. Immunol. Methods 248:91-101, las citocinas se pueden fusionar a un anticuerpo para proporcionar un conjunto de propiedades deseables. Los ejemplos de estas citocinas incluyen linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran las hormonas de crecimiento, como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas de glicoproteína tales como hormona estimulante de foliculo (FSH, por su sigla en inglés), hormona estimulante de la tiroides (TSH, por su sigla en inglés) y hormona luteinizante (LH, por su sigla en inglés); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor-alfa y -beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de mulleriana; péptido asociado con gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformadores (TGF, por su sigla en inglés), tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, -beta y -gamma; factores estimulantes de colonias (CSF, por su sigla en inglés), tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF); y granulocitos-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando kit (KL, por su sigla en inglés). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de orígenes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

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

Cuando los compañeros de inmunoglobulina se usan como conjugados, los compañeros de conjugación se pueden enlazar a cualquier región de una inmunoglobulina descrita en la presente que incluye, pero no se limita al extremo N o C o en algún residuo entre los extremos. Una variedad de enlazadores pueden ser útiles en inmunoglobulinas descritas en la presente para enlazar covalentemente los compañeros de conjugación a una inmunoglobulina. "Enlazador", "secuencia enlazadora", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de estos, en la presente se refieren a una molécula o grupo de moléculas (como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para colocar las dos moléculas en una configuración. Los enlazadores son conocidos en la técnica; por ejemplo los enlazadores homo o hetero-bifuncionales también son conocidos (véase, catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica acerca de reticuladores, páginas 155-200). Se puede usar una cantidad de estrategias para unir moléculas covalentemente entre sí. Estas incluyen, pero no se limitan a, enlaces de polipéptidos entre los extremos N y C de proteínas y dominios de proteínas, enlace mediante

enlace disulfuro y enlace mediante reactivos de reticulación química. En un caso, el enlazador es una unión peptídica, generada por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debería tener una longitud que es adecuada para enlazar dos moléculas de modo tal que asuman la conformación correcta una respecto de la otra de modo que retengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas a estos efectos incluyen residuos de al menos uno y no más de 50 aminoácidos. De manera adecuada, el enlazador tiene de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud, p. ej., un enlazador puede tener 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina (inclusive, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:1), (GGGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:2), y (GGGS)_n (establecido como SEQ ID NO:3), en donde n es un entero de al menos uno), polímeros glicina-alanina, polímeros alanina-serina y otros enlazadores flexibles, como lo comprenderán los expertos en la técnica. De manera alternativa, una variedad de polímeros no proteínicos que incluyen, pero no se limitan a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden ser útiles como enlazadores.

Producción de moléculas de coadhesión

También se describen en la presente métodos para producir y evaluar experimentalmente las moléculas de coadhesión. Los métodos descritos no pretenden limitar las realizaciones a ninguna aplicación o teoría de operación particular. Por el contrario, los métodos proporcionados pretenden ilustrar generalmente que una o más inmunoglobulinas se pueden producir y evaluar experimentalmente para obtener inmunoglobulinas. Los métodos generales para la biología molecular de anticuerpo, expresión, purificación y tamizaje se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76; *Antibodies: A Laboratory Manual* by Harlow & Lane, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

En una realización descrita en la presente, se crean ácidos nucleicos que codifican las moléculas de coadhesión y que luego se pueden clonar en células hospedadoras, expresarse y ensayarse, si se desea. Por lo tanto, se pueden hacer ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifican cada secuencia de proteína. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden ser útiles en la generación de inmunoglobulinas descritas en la presente se describen en *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3^a Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001) y *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons). Como lo comprenderán los expertos en la técnica, la generación de secuencias exactas para una librería que comprende una gran cantidad de secuencias es potencialmente expansiva y consume mucho tiempo. "Biblioteca" en la presente se refiere a un conjunto de variantes en cualquier forma incluyendo, pero sin limitarse a, una lista de secuencias de ácido nucleico o aminoácido, una lista de sustituciones de ácido nucleico o aminoácidos en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de biblioteca o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes, en forma purificada o no purificada. Por consiguiente, hay una variedad de técnicas que se pueden usar para generar bibliotecas descritas en la presente de manera eficaz. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, métodos de ensamblaje genético, método basado en PCR y métodos que usan variaciones de PCR, métodos a base de reacción en cadena de ligasa, métodos oligo agrupados como los usados en transposición sintética, métodos de amplificación propensos al error y métodos que usan oligos con mutaciones aleatorias, métodos clásicos de mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis de casete y otros métodos de amplificación y síntesis genética. Como se conoce en la técnica, hay una variedad de kits comercialmente disponibles y métodos para ensamblaje genético, mutagénesis, subclonación de vectores y similares, y tales productos comerciales encuentran uso para generar ácidos nucleicos que codifican inmunoglobulinas.

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

De manera adecuada, las moléculas de coadhesión se expresan en sistemas de expresión de mamíferos incluyendo sistemas en donde las construcciones de expresión se introducen en las células de mamífero usando virus como retrovirus o adenovirus. Se puede cualquier célula de mamífero, p. ej., células de humano, ratón, rata, hámster y primate. Las células adecuadas también incluyen células de investigación que incluyen, pero no se limitan a, células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NSO y variantes de estas. De manera adecuada, las proteínas de biblioteca se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana se conocen en la técnica e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*. De manera adecuada, las inmunoglobulinas se producen en células de insectos (p. ej. Sf21/Sf9, Trichoplusia ni Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (p. ej. *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). De manera adecuada, las moléculas de coadhesión se expresan *in vitro* usando sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de

traducción *In vitro* derivados de células procariotas (p. ej. *E. coli*) y eucariotas (p. ej. germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y se pueden elegir en función de los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como lo aprecia un experto en la técnica, la traducción *in vitro* es requerida por algunas tecnologías de expresión, por ejemplo expresión de ribosoma. Además, las inmunoglobulinas se pueden producir por métodos de síntesis química. Además los sistemas de expresión transgénicos animales (p. ej., leche de vaca, oveja o cabra, huevo de gallina embrionado, larvas de insectos enteras, etc.) y vegetales (p. ej., maíz, tabaco, etc.).

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

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

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

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

Experimentación *in vitro*

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

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

Las propiedades biofísicas de moléculas de cohesión, por ejemplo estabilidad y solubilidad, se pueden evaluar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de proteína se puede determinar midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y no plegado. Por ejemplo, las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden desplegarse usando desnaturante químico, calor o pH, y esta transición se puede monitorear usando métodos que incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de NMR, calorimetría y preteólisis. Como los comprenderán los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos de las transiciones de plegado y desplegado también se pueden monitorear usando estas y otras técnicas. La solubilidad e integridad estructural global de la molécula de cohesión se puede determinar cuantitativa o cualitativamente usando un amplio rango de métodos conocidos en la técnica. Los métodos que pueden ser útiles para caracterizar las

propiedades biofísicas de las moléculas de cohesión descritas en la presente incluyen electroforesis en gel, enfoque isoelectrico, electroforesis capilar, cromatografía como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de iones y cromatografía líquida de alto rendimiento y fase inversa, mapeo peptídico, mapeo de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbancia ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, ultracentrifugación analítica, barrido de luz dinámica, proteólisis y reticulación, medición de turbidez, ensayos de retardo de filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión a tinte fluorescente, ensayos de tinción de proteína, microscopia y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. El análisis estructural que emplea técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de NMR también puede ser útil. En una realización, la estabilidad y/o solubilidad se puede medir determinando la cantidad de solución de proteína después de algún período definido de tiempo. En este ensayo, la proteína puede o no exponerse a alguna condición extrema, por ejemplo, temperatura elevada, pH bajo o presencia de desnaturizante. Debido a que la función típicamente requiere una proteína estable, soluble y/o bien plegada/estructurada, los ensayos de unión y funcionales que anteceden también proporcionan formas de realizar tal medición. Por ejemplo, una solución que comprende una inmunoglobulina se podría someter a ensayo para determinar su capacidad de unirse a un antígeno diana, luego exponerse a temperatura elevada por uno o más períodos de tiempo definidos, luego someterse a ensayo para determina la unión al antígeno nuevamente. Debido a que no se espera que la proteína no plegada y agregada sea capaz de unirse a un antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medición de la estabilidad y solubilidad de la molécula de cohesión.

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

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

Experimentación in vivo

Las propiedades biológicas de las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden caracterizarse en experimentos de células, tejido y organismos enteros. Como es sabido en la técnica, los fármacos se evalúan frecuentemente en animales incluyendo, pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad u otras propiedades de un fármaco. Se puede hacer referencia a estos animales como modelos de enfermedad. Respecto de las moléculas de cohesión descritas en la presente, un desafío particular surge al usar modelos animales para evaluar el potencial de la eficacia en seres humanos de los

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

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

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

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

Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el uso de modelos animales para caracterizar la potencial eficacia de anticuerpos terapéuticos candidatos en un paciente humano, algunos polipéptidos variantes descritos en

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

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

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

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

Las moléculas de cohesión descritas en la presente pueden conferir farmacocinética superior a los productos terapéuticos que contienen Fc en sistemas animales o en seres humanos. Por ejemplo, una mayor unión a FcRn puede aumentar la semivida y exposición del fármaco que contiene Fc. De manera alternativa, una menor unión a FcRn puede reducir la semivida y exposición del fármaco que contiene Fc en casos en que la exposición reducida es favorable tal como los casos en que tal fármaco tiene efectos secundarios.

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

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

Uso

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

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

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

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

En la presente se describen métodos novedosos para tratar trastornos mediados por IgE, p. ej., alergias a los alimentos y ambientales y asma alérgica. De manera adecuada, las enfermedades alérgicas que se pueden tratar por los productos y métodos de la invención incluyen asma alérgica y atópica, dermatitis atópica y eczema, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y rinoconjuntivitis, encefalomielititis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica y choque anafiláctico. Las alergias ambientales y a los alimentos que se pueden tratar incluyen alergias al ácaro del polvo, cucaracha, gato y otros animales, polen (incluyendo ambrosía, gramíneas de Bermuda, cardo de Rusia, roble, centeno y otros), moho y hongos (p. ej., *Alternaria alternata*, *Aspergillus* y otros), látex, picaduras de insectos (abeja, avispa y otros), penicilina y otras drogas, frutillas y otras frutas y vegetales, maní, soja y otras legumbres, nuez y otras nueces de árboles, crustáceos y otros mariscos, leche y otros productos lácteos, trigo y otros granos y huevos. De hecho, cualquier alérgeno de alimentos, aeroalérgeno, alérgeno ocupacional u otro alérgeno ambiental mediado por IgE se puede tratar por una cantidad terapéutica de los productos descritos en la presente invención. Por ejemplos de alérgenos comunes, véase Arbes et ál., *Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*, *Clinical Gastroenterology* 116(2), 377-383 (2005).

También se describen pruebas de diagnóstico para identificar pacientes que probablemente muestren una respuesta clínica favorable a una molécula de cohesión descrita en la presente o que probablemente presenten una respuesta considerablemente mejor cuando se tratan con una molécula de cohesión descrita en la presente en contraste con uno o más productos terapéuticos usados actualmente. Se puede usar cualquiera de una cantidad de

métodos conocidos en la técnica para determinar polimorfismos de FcγR en seres humanos. Además, también se describen pruebas de diagnóstico realizadas en muestras clínicas como muestras de sangre y tejido. Estas pruebas pueden estudiar la actividad, independientemente del mecanismo. Esta información se puede usar para identificar pacientes para la inclusión o exclusión en pruebas clínicas o para informar decisiones respecto de las dosificaciones y regímenes de tratamiento apropiados. Tal información también se puede usar para seleccionar un fármaco que contiene una molécula de cohesión particular que muestra actividad superior en tal ensayo.

Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formula una molécula de cohesión descrita en la presente y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las moléculas de cohesión descritas en la presente se preparan para almacenarse mezclando dicha inmunoglobulina con el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los destinatarios en las dosificaciones y las concentraciones empleadas e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metilo o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; endulzantes y otros agentes saborizantes; rellenos como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes aglutinantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína Zn) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una realización, la composición farmacéutica que comprende la inmunoglobulina descrita en la presente puede estar en una forma soluble en agua, como presente como sales farmacéuticamente aceptables, que incluye tanto sales de adición de ácido como de base. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" hace referencia a aquellas sales que mantienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de otro modo indeseables, formadas con ácidos inorgánicos como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adición de base farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas de bases inorgánicas como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Algunas realizaciones incluyen al menos una de sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales que derivan de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio de iones como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

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

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

administración a base de microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólido (PLG).

Administración

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

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

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

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

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

30 Además, cualquiera de una cantidad de sistemas de administración se conocen en la técnica y se pueden usar para administrar los anticuerpos descritos en la presente. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (p. ej., microesferas PLA/PGA) y similares. De manera alternativa, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, inclusive membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material o matriz polimérica como poliésteres, hidrogeles, poli(vinilalcohol), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico como Lupron Depot® y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina descrita en la presente, por ejemplo por infección retroviral, inyección directa o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular u otros agentes de transfección. En todos los casos, los sistemas de liberación controlada se pueden usar para liberar la inmunoglobulina en la locación de acción deseada o cerca de esta.

Dosificación

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

40 La concentración de la molécula de coadhesión terapéuticamente eficaz en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100 % en peso. De manera adecuada, la concentración de la molécula de coadhesión se encuentra en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Para tratar a un paciente, se puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoglobulina descrita en la presente. En la presente, "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del

propósito del tratamiento y será determinada por un experto en la técnica mediante técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo, 0,1, 1, 10, o 50 mg/kg de peso corporal. En un caso, las dosificaciones varían de 1 a 10 mg/kg.

5 De manera adecuada, solo se usa una dosis única de la molécula de cohesión. En otros casos, se administran múltiples dosis de la molécula de cohesión. El tiempo que pasa entre administraciones puede ser menor que 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas o más de 2 semanas.

10 De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente se administran en regímenes de dosificación metronómicos, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin períodos de reposo extendidos. Esta administración metronómica puede implicar dosificación en intervalos constantes sin períodos de reposo. Típicamente, estos regímenes abarcan infusión crónica de baja dosis o continua por un período de tiempo extendido, por ejemplo 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses o hasta 6 meses o más. El uso de dosis menores puede
15 minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de reposo.

De manera adecuada, las moléculas de cohesión descritas en la presente y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales se administran cíclicamente al paciente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente en un momento, un segundo agente en un segundo momento, opcionalmente agentes adicionales en momentos adicionales, opcionalmente un período de reposo y luego repetir la secuencia de administración una o
20 más veces. La cantidad de ciclos es típicamente de 2-10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

Terapias de combinación

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

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

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

Las terapias de la descripción se pueden combinar con otras inmunoterapias incluyendo vacunas antialérgicas, así como otros antagonistas de IgE o Fc ϵ R ϵ s. Las terapias de la descripción se pueden combinar con antagonistas de quimiocinas o citocinas, incluyendo pero sin limitarse a anticuerpos y fusiones Fc, incluyendo pero sin limitarse a inhibidores de quimiocinas CCR3, CCR4, CCR8 y CRTH2 y CCR5, e inhibidores de citocinas IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-21, familia de clase II de receptores de citocina IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31 e IL-33. Las terapias de la descripción se pueden combinar con moduladores de la adhesión, factores de transcripción y/o señalización intracelular. Por ejemplo, las inmunoglobulinas de la invención se pueden combinar con moduladores de NF- κ B, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFAT, supresores de la señalización de citocina (SOCS), receptores activados por el proliferador de peroxisoma (PPAR), cinasa MAP, p38 MAPK, JNK y receptores de fosfato de esfingosina I. Las terapias de la descripción se pueden administrar con tolilato suplatast, inhibidores de fosfodiesterasa 4 (PDE4), bloqueadores del canal de calcio y moléculas tipo heparina. Las posibles co-terapias de la descripción se describen en más detalle en Caramori et ál., 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3-S1-S6.

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

Ejemplos

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

Ejemplo 1. Métodos novedosos para inhibir células IgE+ FcγRIIb +

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

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

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

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

30 Una estrategia novedosa para inhibir una enfermedad mediada por IgE, ilustrada en la Figura 1, es inhibir las células B IgE+ (es decir, las células B que expresan IgE anclada a la membrana) mediante la cohesión de IgE anclada a la membrana y el receptor inhibidor FcγRIIb. En células B a las que se les cambió la clase para expresar IgE, mIgE sirve como BCR (denominado en la presente mIgE BCR). Este enfoque potencialmente inhibiría el mecanismo biológico natural de la supresión mediada por complejo inmune de la activación de células B, evitando así la diferenciación en células plasmáticas que producen IgE. Las células plasmáticas que producen IgE residen en la médula ósea y probablemente tienen una vida de varias semanas a varios meses. Debido a que las nuevas células plasmáticas que secretan IgE atraviesan etapas de células B que expresan mIgE durante la diferenciación, si su generación es abrogada por la inhibición de sus precursores de células B mIgE+ con este tratamiento anti-IgE, las células plasmáticas existentes morirán en un período de semanas a meses y por lo tanto la producción de IgE también se reducirá gradualmente. Cabe destacar que la inhibición de las células B de memoria IgE+, que tienen mIgE, también se inhibirían por inmunoglobulinas anti-IgE que co-adhieren FcγRIIb con alta afinidad. Si esto ocurre, la terapia puede tener un efecto de largo plazo en la enfermedad fundamental.

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

En condiciones fisiológicas, la unión del BCR con FcγRIIb y posterior supresión de las células B ocurre mediante complejos inmunes de IgG y antígeno cognado. La estrategia de diseño era reproducir este efecto usando un único anticuerpo de reticulación. IgG humana se une a FcγRIIb con afinidad débil (mayor que 100 nM para IgG1) y la inhibición mediada por FcγRIIb ocurre en respuesta a los complejos inmunes pero no IgG monomérica. Se razonó que la alta afinidad a este receptor (menor que 100 nM) sería necesaria para la inhibición máxima de la activación de células B. Para mejorar la actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IgE de la invención, la región Fc se modificó genéticamente con variantes que mejoran la unión a FcγRIIb. Se han descrito variantes Fc modificadas genéticamente que se unen a FcγRIIb con mejor afinidad respecto de IgG1 natural (USSN 12/156,183 (US 2009-0136485 A1), presentada el 30 de mayo de 2008, con el título "Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing cells").

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

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

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

Un conjunto representativo de sensogramas para la unión de anticuerpos anti-CD19 variantes selectos a FcγRIIb se muestra en la Figura 2. Las afinidades de todas las variantes e IgG1 WT (natural) a todos los FcγRs, obtenidas de ajustes de los datos de unión Biacore, se grafican en la Figura 3 y se proporcionan numéricamente en la Figura 4. Mientras que IgG1 Fc WT se une con FcγRIIb con afinidad μM ($K_D = 1,8 \mu\text{M}$ en la Figura 4), una cantidad de variantes, por ejemplo G236D/S267E, S239D/S267E y S267E/L328F se han modificado genéticamente que se unen al receptor inhibitorio más estrechamente. La variante S239D/I332E, como se describe en USSN 11/124,620 (US 2006-0024298 A1), también tiene afinidad mejorada por los receptores de activación FcγRIIa y FcγRIIIa, y por lo tanto es capaz de citotoxicidad mediada por célula dependiente del anticuerpo (ADCC) mejorada y mediada y fagocitosis (ADCP). La variante G236R/L328R, también denominada inactivación de Fc o Fc-KO, no tiene unión a los receptores Fc y se usa como control en los experimentos descritos en la presente.

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

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

- 5 Los anticuerpos anti-IgE IgG1 variantes y naturales se evaluaron para determinar la unión a IgE y a FcγRIIb usando Biacore. El ADN que codifica la región Fc de IgE, que contiene el sitio de unión de los anticuerpos anti-IgE usados, se sintetizó (Blue Heron Biotechnologies) y se subclonó en el vector pTT5. Fc de IgE se expresó en células 293E y se purificó usando proteína A como se describe anteriormente. Las mediciones de SPR se realizaron usando el método de captura de proteína A/ anticuerpo descrito anteriormente, excepto que el analito era FcγRIIb o la región Fc del IgE. La adquisición y ajuste de datos se describen anteriormente. La Figura 8 proporciona las constantes de unión de equilibrio (K_D) resultantes obtenidas de estos experimentos de unión, así como la afinidad en veces respecto de la IgG1 natural para unirse a FcγRIIb. La Figura 9 muestra gráficas de estos datos. Los resultados confirman el máximo de afinidad de los anticuerpos para IgE y que la variante S267E/L328F mejora la unión a FcγRIIb por dos órdenes de magnitud, lo que es coherente con los resultados anteriores.
- 10
- 15 El uso de variantes particulares, por ejemplo, S267E/L328F y S239D/I332E, se desea en la presente como prueba de concepto de los mecanismos como se describe en la presente y no pretende restringir la invención a su uso particular. Los datos suministrados en USSN 12/156,183 y USSN 11/124,620 indican que una cantidad de variantes modificadas genéticamente, en posiciones Fc específicas, proporcionan las propiedades deseadas. Las sustituciones para mejorar la afinidad de FcγR, en particular a FcγRIIb, incluyen: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332. De manera adecuada, las sustituciones se hacen al menos a una o más de las siguientes posiciones no taxativas para mejorar la afinidad a FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268 y 328.
- 20

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

25

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

30

Las combinaciones de sustituciones para mejorar la afinidad a FcγRIIb incluyen:

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

35

40

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

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

La Figura 10 muestra la captura de IgE con varios anticuerpos IgE anti-humanos, incluyendo un grupo de tres anticuerpos anti-IgE monoclonales (MabTech; 107/182/101), MaE11_IgG1_G236R/L328R y Omalizumab_IgG1_G236R/L328R. Los datos muestran el reactivo de anticuerpo anti-IgE comercial (MabTech), Omalizumab, y su anticuerpo quimérico original MaE11 pueden capturar IgE. Para usar este ensayo para detectar IgE, fue necesario determinar si los anticuerpos MaE11 y omalizumab interferirían con la captura de IgE por reactivo anti-IgE MabTech. Este ensayo se repitió como se describe anteriormente y la concentración de IgE de absorbancia

55

se calculó usando una curva estándar. La Figura 11 muestra que el anticuerpo anti-IgE omalizumab_G236R/L328R no compite con el anticuerpo anti-IgE MabTech en el protocolo ELISA actual.

Los anticuerpos anti-IgE de variante Fc se evaluaron para determinar su capacidad de inhibir células B IgE+. Las PBMC humanas se indujeron a cambio de clase a células B que producen IgE agregando 5 ng/ml de interleucina-4 (IL-4) y 100 ng/ml de anticuerpo anti-CD40 (clon G28.5 IgG1). El anticuerpo anti-CD40 es un agonista de CD40 y por lo tanto imita la actividad del coactivador CD40L. Se agregaron varias concentraciones de anticuerpos anti-IgE y las muestras se incubaron durante 12 días. Las placas ELISA se prepararon y bloquearon como se describe anteriormente usando 5 ug/ml de anti-IgE Mabtech como anticuerpo de captura. 100 ul de las muestras de PBMC se agregaron e incubaron >3 horas y luego se lavaron con TTBS 3x (200 ul). El anticuerpo conjugado a HRP de anticuerpo se agregó y detectó como se describe anteriormente. La absorbancia a 450 nm se convirtió a concentración de IgE usando una curva estándar. Los resultados se muestran en la Figura 12. Los anticuerpos que no tienen unión a FcγR (variantes G236R/L328R) o que no tienen especificidad por IgE (anticuerpo anti-RSV Motavizumab) no tuvieron efecto en la producción de IgE de las células B diferenciadas. Por el contrario, los anticuerpos variantes con mayor afinidad a FcγRIIb inhibieron la producción de IgE. Estos datos sugieren que la cohesión de IgE de superficie y el receptor de FcγR inhibidor FcγRIIb inhibe las células B de clase cambiada de ese tipo de inmunoglobulina. La inhibición de células B IgE+ reduce la cantidad de células plasmáticas que expresan IgE, que a su vez reducen la cantidad de IgE detectada. Para evaluar la selectividad de esta actividad por las células B que producen IgE, IgG2 humano se midió para las mismas muestras usando un ELISA e IgG2 (Bethyl Laboratories). La Figura 13 muestra que la secreción de IgG2 no se inhibió, lo que indica que la actividad inhibidora de anticuerpos anti-IgE con alta afinidad por FcγRIIb es selectiva de las células de clase cambiada IgE+. La repetición de este experimento usando versiones variantes del anticuerpo anti-IgE aprobado Omalizumab mostró resultados inhibidores similares por la variante con alta afinidad a FcγRIIb (Figura 14).

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

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

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

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

Los donantes de sangre se estudiaron para detectar alergia al antígeno del ácaro del polvo según la presencia de anticuerpos anti-IgE contra Der p 1. Un donante con reactividad positiva se sometió a leucoféresis para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC). El protocolo del estudio se proporciona en la Figura 20. Un día antes de la inyección de PBMC, a los ratones se les dieron inyecciones intraperitoneales (i.p.) con 100 ul de anticuerpo anti-asialo GM (Wako, Richmond, VA) para vaciar los linfocitos citotóxicos (NK) de murino. Al día siguiente, los ratones se inyectaron i.p. 3×10^7 PBL en un volumen de 0,5 ml. Después de la inyección de PBMC, los ratones se asignaron a 5 grupos diferentes de ratones con 7 ratones en cada grupo. El día 7 después de la inyección de PBMC, se recogió la sangre de todos los animales mediante punción retroorbital de seno/plexo (OSP) para la determinación de los niveles de IgG e IgE humana por ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dos días después (día 9), los ratones se inyectaron i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. El día 11, los ratones se inyectaron i.p. con 15 ug de antígeno de ácaro del polvo Der p 1 (LoTox Natural Der p 1, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA). El día 23 (12 días después de la vacunación con antígeno), se recogió sangre de todos los ratones para determinar los anticuerpos IgG e IgE humanos. El mismo día, los ratones recibieron una segunda inyección i.p. con 10 mg/kg de anticuerpo o PBS. Dos días después (día 25), los ratones recibieron una vacunación de refuerzo i.p. de 10 ug de antígeno de

ácaro de polvo Der p 1. El día 37 (12 días después del refuerzo de antígeno), se recogió sangre por OSP para la determinación de inmunoglobulina humana. Las concentraciones de IgG e IgE humana se midieron usando métodos ELISA similares a los descritos anteriormente.

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

20 La descripción también incluye la materia de las reivindicaciones de WO2010/033736 del que deriva la presente solicitud, el contenido del cual se reproduce a continuación como párrafos enumerados.

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

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

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

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

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

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

35 Párrafo 7. La molécula de cohesión del párrafo 6, en donde dicha variante Fc comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc en comparación con el polipéptido Fc original, en donde dicha modificación se selecciona del grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 y 332, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU.

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

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

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

Párrafo 11. Un anticuerpo que comprende una región variable y una región Fc, en donde dicha región variable se une a IgE anclada a la membrana, y en donde dicha región Fc se une a FcγRIIb con una Kd menor que aproximadamente 100 nM.

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

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

55

Listado de secuencias

- <110> Xencor, Inc.
Desjarlais, John R.
Chu, Seung Y
Horton, Holly M.
 - <120> Nuevas Composiciones y Métodos para Tratar Trastornos Mediados por IgE
 - <130> 067461-5143-WO
 - <140> PCT/US2009/057366
 - <141> 17-09-2009
 - <150> US 61/097.819
 - <151> 17-09-2008
 - <160> 45
 - <170> PatentIn versión 3.5
 - <210> 1
 - <211> 121
 - <212> PRT
 - <213> Secuencia Artificial
 - <220>
 - <223> VH Omalizumab Humanizado
 - <400> 1
- 1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
- Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
- Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
- Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60
- Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
 65 70 75 80
- Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90
- Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110
- Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
- <210> 2
 - <211> 9
 - <212> PRT
 - <213> Mus musculus
 - <400> 2

Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp
 1 5
 <210> 3
 5 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 10 **Thr Tyr Asp Gly Ser**
 1 5
 <210> 4
 15 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 20 **Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val**
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 111
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> VL Omalizumab Humanizado
 30 <400> 5
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 35 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 40 <400> 6

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

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

 <400> 7

 Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser
 10 1 5

 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus

 <400> 8

 Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 20 1 5

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

 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

 30 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus

 <400> 10

Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp
 1 5
 <210> 11
 <211> 5
 5 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 Thr Tyr Asp Gly Ser
 10 1 5
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 12
 Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val
 20 1 5 10
 <210> 13
 <211> 111
 <212> PRT
 25 <213> Mus musculus
 <400> 13
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
 20 25 30
 Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Ile Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser Glu Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Phe Tyr Cys Gln Gln Ser His
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 30 100 105 110
 <210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 <400> 14
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr
 40 1 5 10

<210> 15
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 5
 <400> 15
 Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser
 1 5
 10
 <210> 16
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 15
 <400> 16
 Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr
 1 5
 20
 <210> 17
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25
 <223> VH H1L1MaE11 Humanizado
 <400> 17
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
 100 105 110
 30
 Ala Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 35
 <400> 18

ES 2 589 852 T3

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

ES 2 589 852 T3

<212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23

5 **Ala Ala Ser Tyr Leu Gly Ser**
 1 5

<210> 24
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 24

15 **Ser His Glu Asp Pro Tyr Thr**
 1 5

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

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Mus musculus

<400> 26

Tyr Thr Phe Ser Met Tyr Trp
 1 5

35 <210> 27
 <211> 6
 <212> PRT

ES 2 589 852 T3

<213> Mus musculus

<400> 27

5 Ser Pro Gly Thr Phe Thr
1 5

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 28

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

<210> 29

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 29

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

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

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

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

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

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

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

25 <210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

30 <400> 30

Gln Ser Ile Gly Thr Asn
1 5

<210> 31

35 <211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 31

ES 2 589 852 T3

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
1 5

<210> 32

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Ser Asp Ser Trp Pro Thr Thr
1 5

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

20 <210> 34

<211> 330

<212> PRT

<213> Mus musculus

25 <400> 34

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 35
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> variante Artificial de cadena constante IgG1 S267E/L328F

10

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

<210> 36

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

10

<400> 36

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

10 <400> 37

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 38
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Variante Artificial de cadena pesada IgG1 Omalizumab

10

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 39

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> S267E/L328F Omalizumab Humanizado Artificial de cadena pesada

<400> 39

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 40
<211> 218
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> H1L1 MaE11 cadena ligera (VH-C) Artificial Humanizado

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> H1L1 MaE11 IgG1 cadena pesada Artificial Humanizado

10 <400> 41

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 42
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> H1L1 MaE11 S267E/L328F cadena pesada Artificial Humanizado

<400> 42

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 589 852 T3

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

- <210> 43
- <211> 5
- 5 <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial

- <220>
- <223> ligante glicina serina
- 10 <400> 43
- gsggs 5
- 15 <210> 44
- <211> 5
- <212> DNA
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> ligante glicina serina
- <400> 44
- 25 ggggs 5
- <210> 45
- <211> 4
- <212> DNA
- 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> ligante glicina serina
- 35 <400> 45
- gggs 4

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende:
 - a) una cadena pesada con SEQ ID NO:42; y
 - b) una cadena ligera con SEQ ID NO:40.
- 5 2. Una composición de ácido nucleico que comprende:
 - a) un primer ácido nucleico que codifica una cadena pesada con SEQ ID NO:42; y
 - b) un segundo ácido nucleico que codifica una cadena ligera con SEQ ID NO:40.
3. Una célula hospedadora que comprende la composición de ácido nucleico de la reivindicación 2.
4. Un método para producir un anticuerpo que comprende:
 - 10 a) cultivar una célula hospedadora según la reivindicación 3 en condiciones en donde dicho anticuerpo se produce; y
 - b) recuperar dicho anticuerpo.

Figura 1

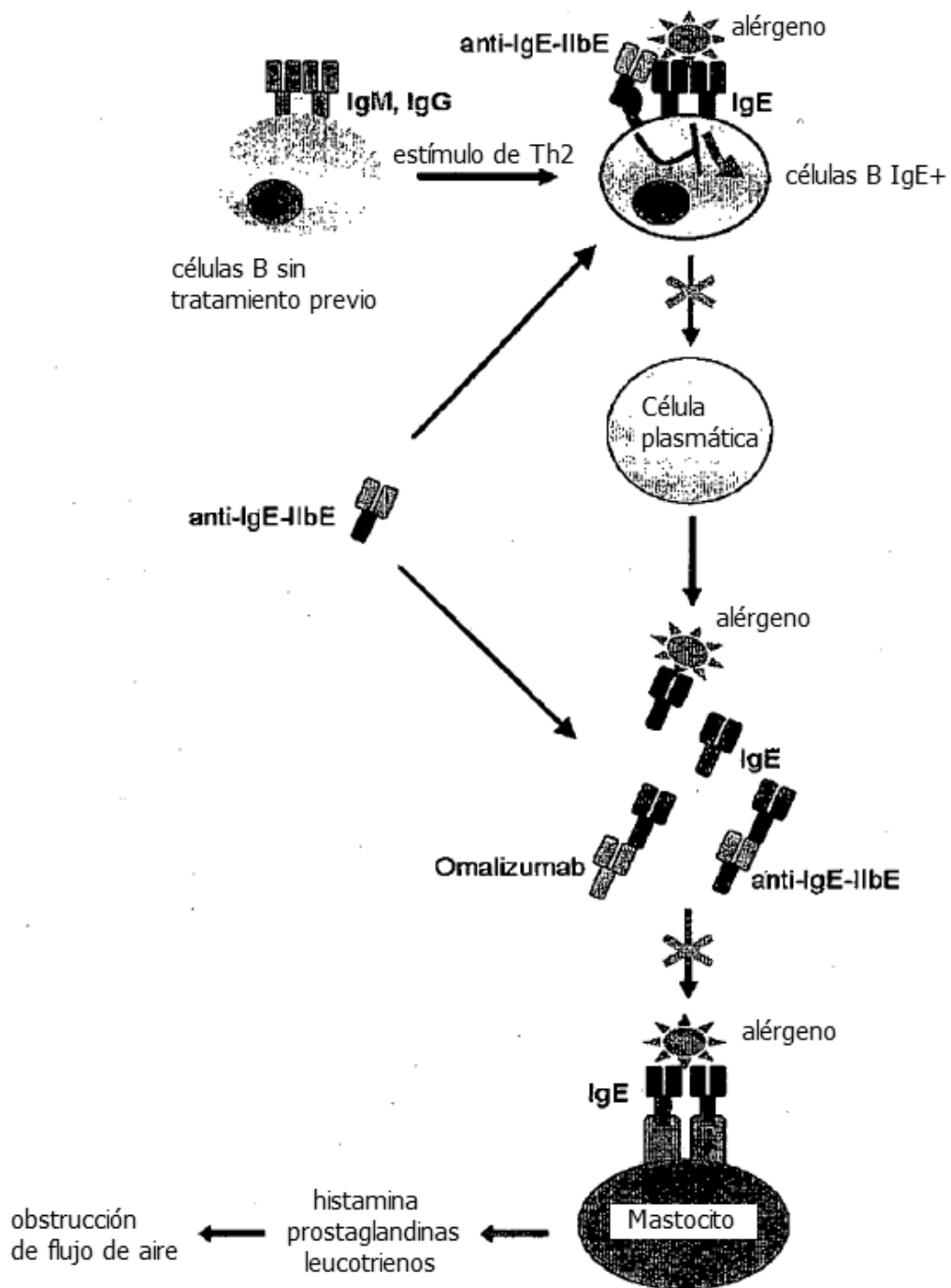


Figura 2

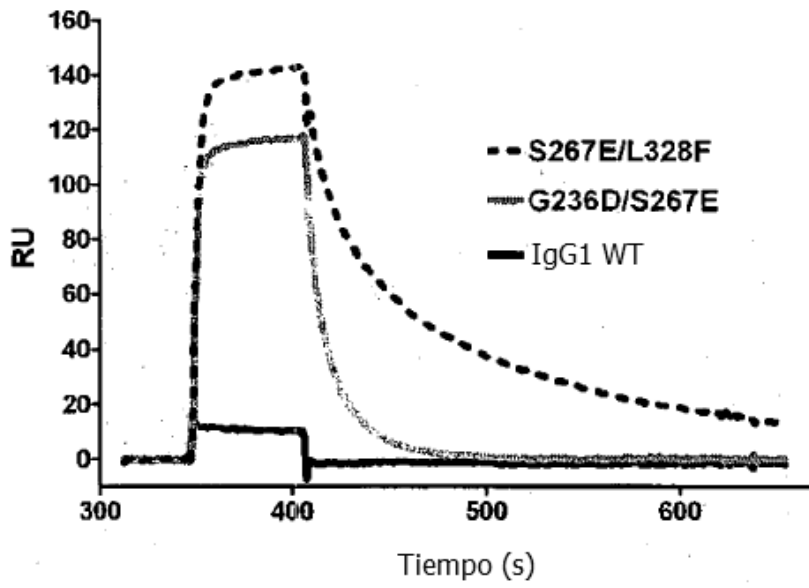


Figura 3

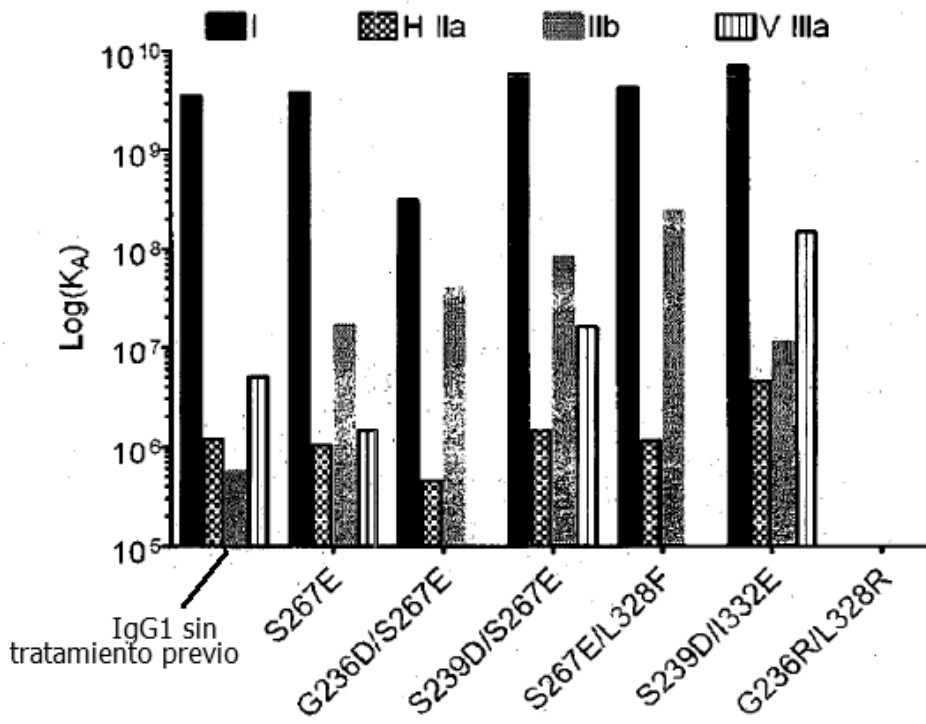


Figura 4

| Anticuerpo | FcγRI | | H131 FcγRIIa | | FcγRIIb | | V158 FcγRIIIa | |
|--------------|---------|-------|--------------|-------|---------|-------|---------------|-------|
| | KD (M) | Veces | KD (M) | Veces | KD (M) | Veces | KD (M) | Veces |
| IgG1 natural | 2.8E-10 | 1.0 | 8.5E-07 | 1.0 | 1.8E-06 | 1.0 | 2.0E-07 | 1.0 |
| S267E | 2.6E-10 | 1.1 | 9.6E-07 | 0.89 | 6.0E-08 | 30 | 6.9E-07 | 0.29 |
| G236D/S267E | 3.2E-09 | 0.088 | 2.2E-06 | 0.39 | 2.5E-08 | 72 | n.d. | |
| S239D/S267E | 1.7E-10 | 1.6 | 7.0E-07 | 1.2 | 1.2E-08 | 150 | 6.2E-08 | 3 |
| S267E/L328F | 2.3E-10 | 1.2 | 8.8E-07 | 0.97 | 4.2E-09 | 429 | n.d. | |
| S239D/I332E | 1.4E-10 | 2.0 | 2.2E-07 | 3.9 | 8.8E-08 | 20 | 6.8E-09 | 29 |
| G236R/L328R | n.d. | | n.d. | | n.d. | | n.d. | |

Figura 5

Omalizumab VH (SEQ ID NO:1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNY
NPSVKGRITISRDDSKNTFYLMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTS
S

Omalizumab VH CDR1 (SEQ ID NO:2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEQ ID NO:3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEQ ID NO:4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEQ ID NO:5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEQ ID NO:6)

QSVDDYDGDY

Omalizumab VL CDR2 (SEQ ID NO:7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEQ ID NO:8)

SHEDPYT

MaE11 VH (SEQ ID NO:9)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNY
NPSLKNRISVTRDTSQNQFFLKLNSATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTS
S

MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEQ ID NO:13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYMNWYQQKPGQPPILLIYAASYLGSEI
PARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:14)

QSVDDYDGDY

MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:15)

AASYLGS

Figura 5 (continuación)

MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:16)

SHEDPYT

H1L1MaE11 VH (SEQ ID NO:17)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWVIRQPPGKKLEWIGSITYDGSSNYPNPSLKSRVTIS
RDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTVSS

H1L1 MaE11 VH CDR1 (SEQ ID NO:18)

YSITSGYSW

H1L1 MaE11 VH CDR2 (SEQ ID NO:19)

TYDGS

H1L1 MaE11 VH CDR3 (SEQ ID NO:20)

GSHYFGHWHFVAV

H1L1 MaE11 VL (SEQ ID NO:21)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGDSDYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
IPARFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

H1L1 MaE11 VL CDR1 (SEQ ID NO:22)

QSVDYDGDSDY

H1L1 MaE11 VL CDR2 (SEQ ID NO:23)

AASYLGS

H1L1 MaE11 VL CDR3 (SEQ ID NO:24)

SHEDPYT

TES-C21 VH (SEQ ID NO:25)

QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYTFSMYWLEWVKQRPGHGLEWVGEISPGTFTTN
YNEKFKAKATFTADTSSNTAYLQLSGLTSEDSAVYFCARFSHFSGSNYDYFDYWGQGTSLT
VSS

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

YTFSMYW

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

SPGTFT

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

FSHFSGSNYDYFDY

TES-C21 VL (SEQ ID NO:29)

DILLTQSPAILSVPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTDGPRLLIKYASESISGIPSRFSG
SGSGTEFTLNINSVESEDIADYYCQQSDSWPTTFGGGKLEIK

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

QSIGTN

Figura 5 (continuación)

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

YASESIS

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

SDSWPTT

Figura 6

Cadena ligera Ckappa (SEQ ID NO:33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 7

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

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLES
G VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
T LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGS
TNY NPSVKGRITISRDDSKNTFY LQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHF
FAVWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

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

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA VSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGS
TNY NPSVKGRITISRDDSKNTFY LQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHF
FAVWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

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

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGD SYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSE
IPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
L SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC A VSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGS
SNYNPSLKSRTIS RDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHF
FAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

H1L1 MaE11 S267E/L328F heavy chain (SEQ ID NO:42)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC A VSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGS
SNYNPSLKSRTIS RDTSKNQFSLKSSVTAADTAVYYCARGSHYFGHWHF
FAVWGAGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Figura 8

| Anticuerpo | IgE KD (M) | FcγRIIb KD (M) | FcγRIIb Veces |
|-----------------------------|---------------|-------------------|------------------|
| Omalizumab_IgG1_WT | 2.2E-10 | 1.94E-06 | 1.0 |
| Omalizumab_IgG1_S267E/L328F | 2.0E-10 | 1.4E-08 | 135 |
| MaE11_H1L1_IgG1_WT | 6.1E-11 | 2.0E-06 | 1.0 |
| MaE11_H1L1_IgG1_S267E/L328F | 6.3E-11 | 5.6E-09 | 366 |
| MaE11_H1L1_IgG1_G236R/L328R | 6.4E-11 | NB | |

Figura 9

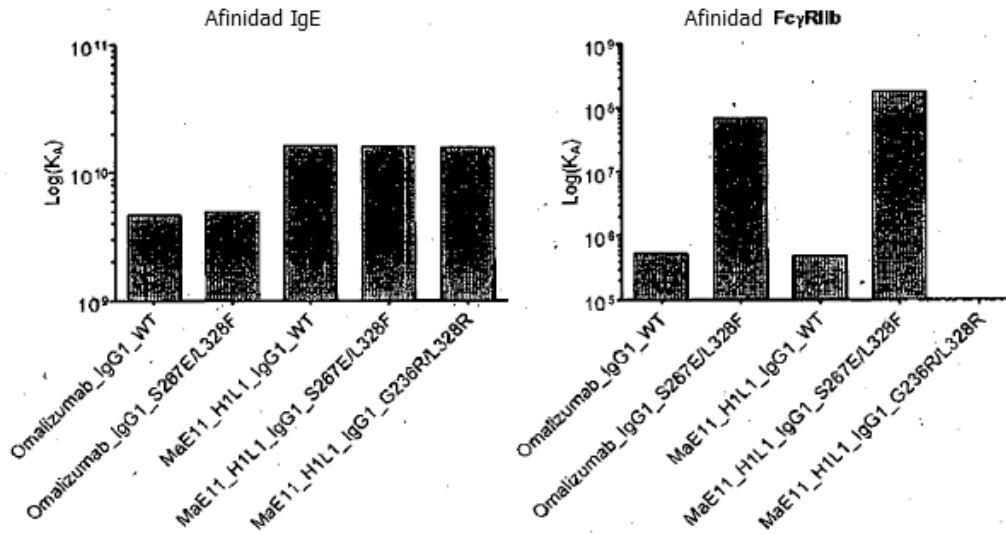


Figura 10

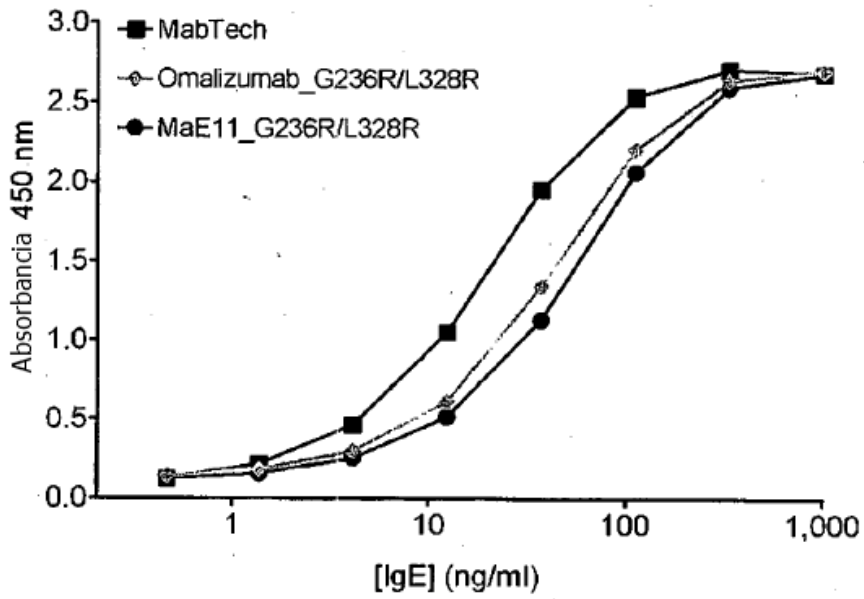


Figura 11

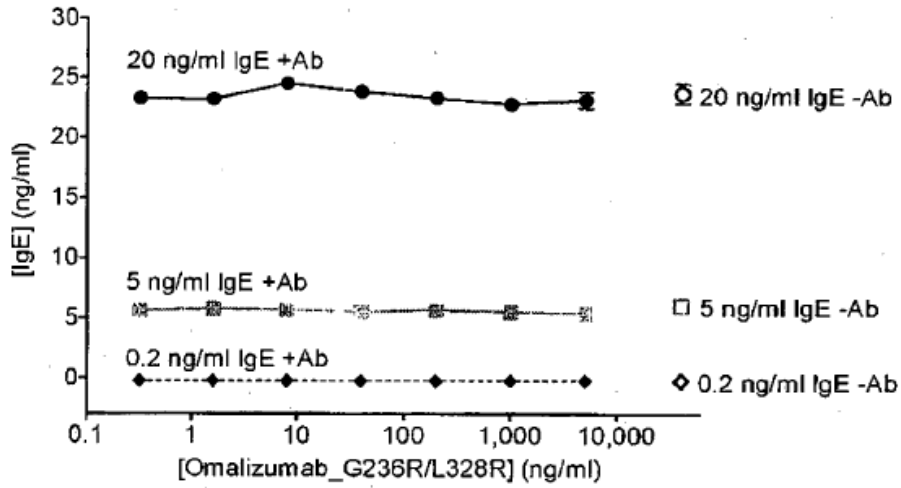


Figura 12

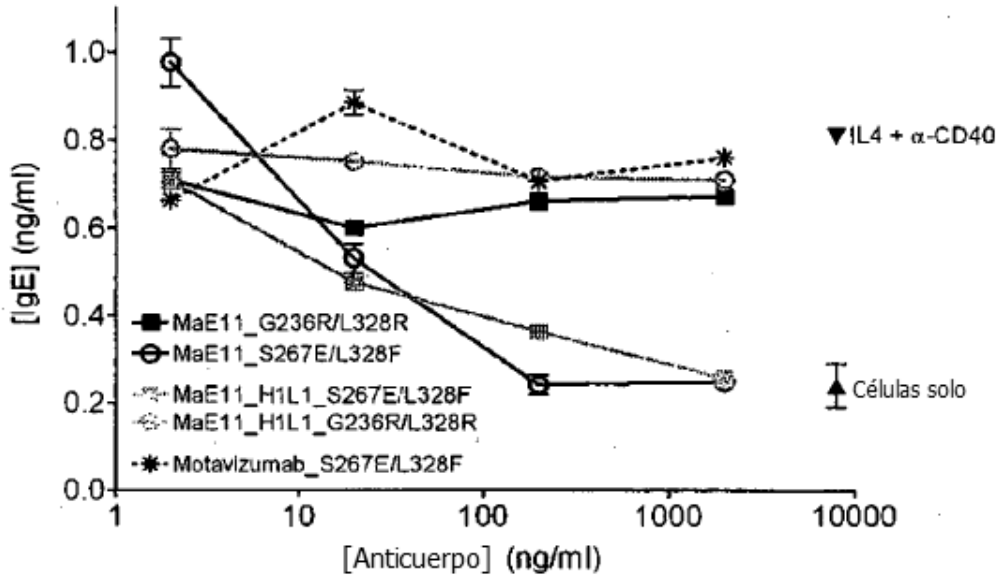


Figura 13

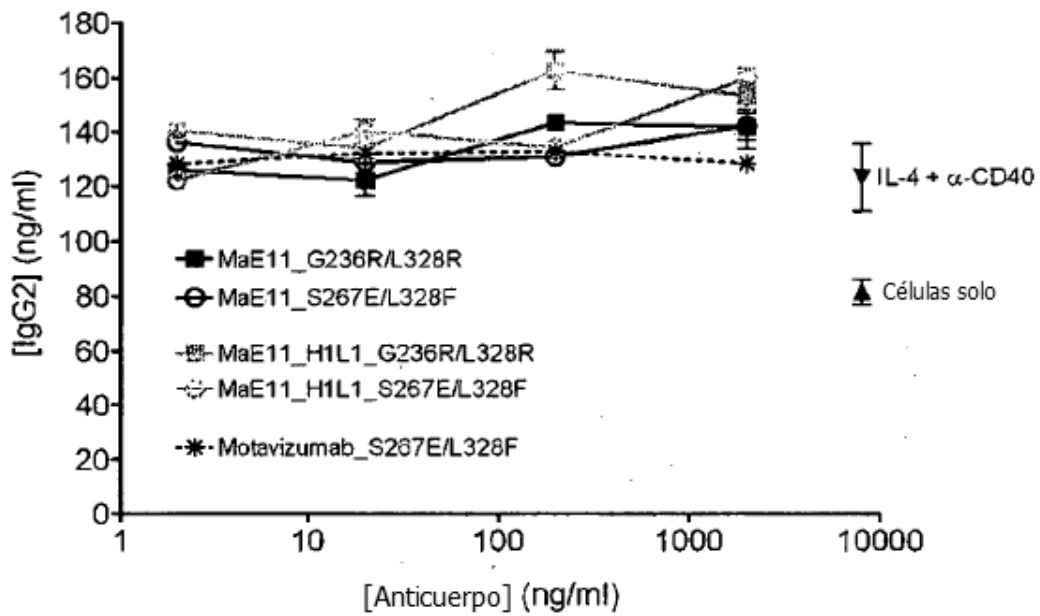


Figura 14

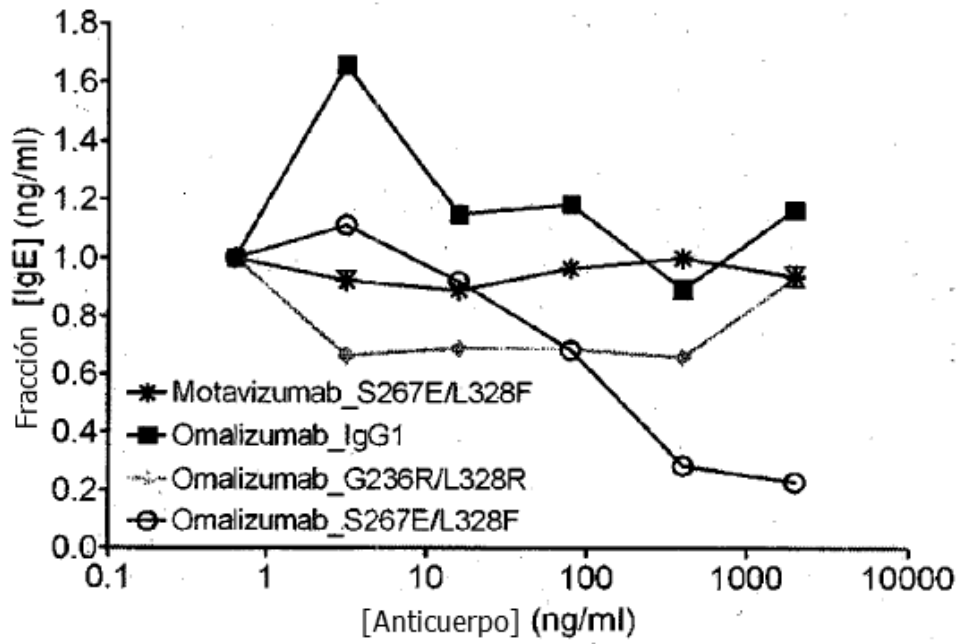


Figura 15

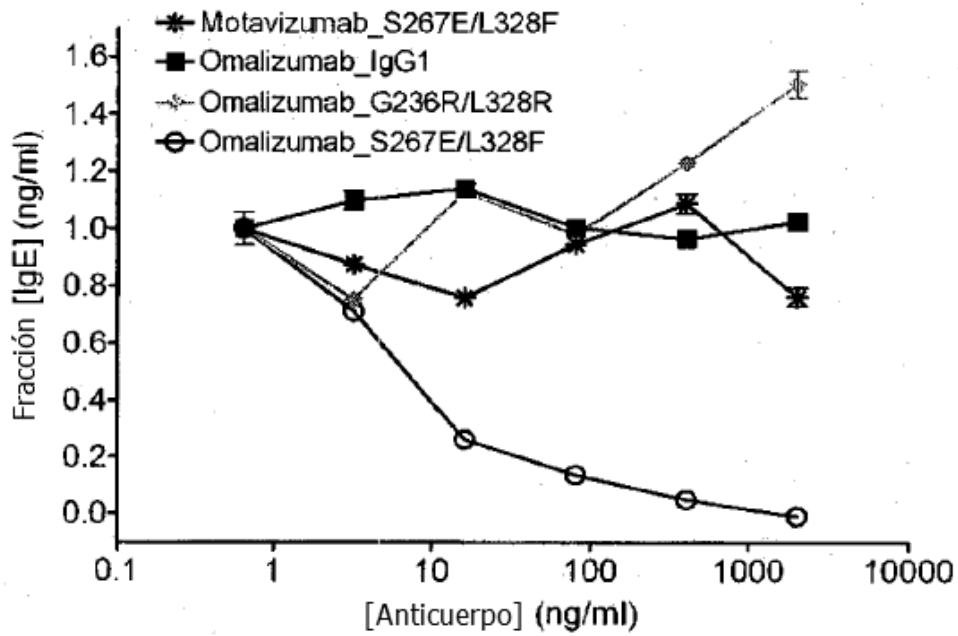


Figura 16

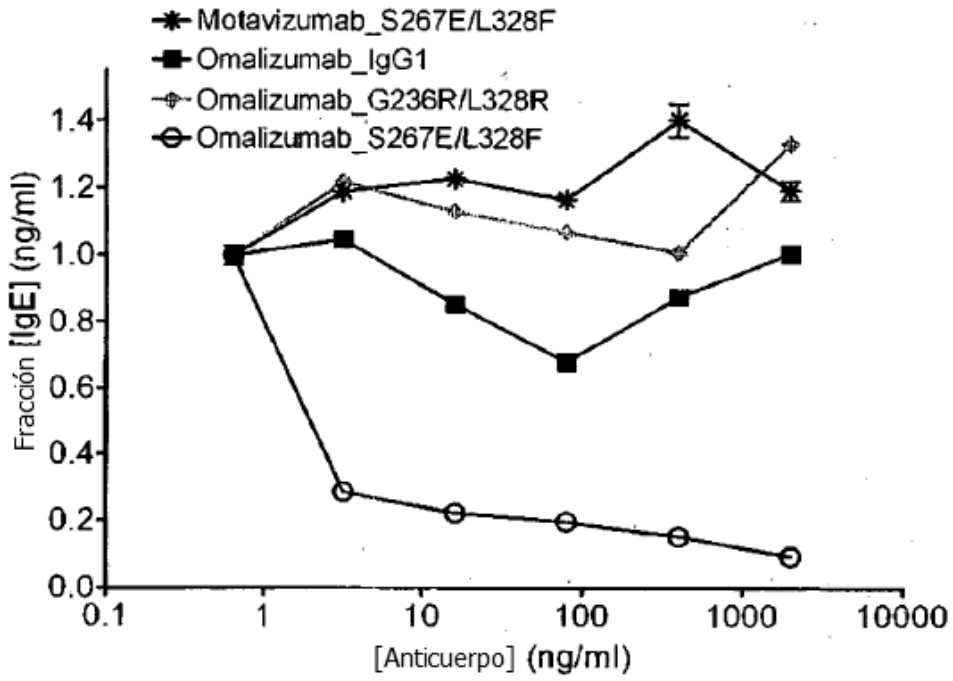


Figura 17

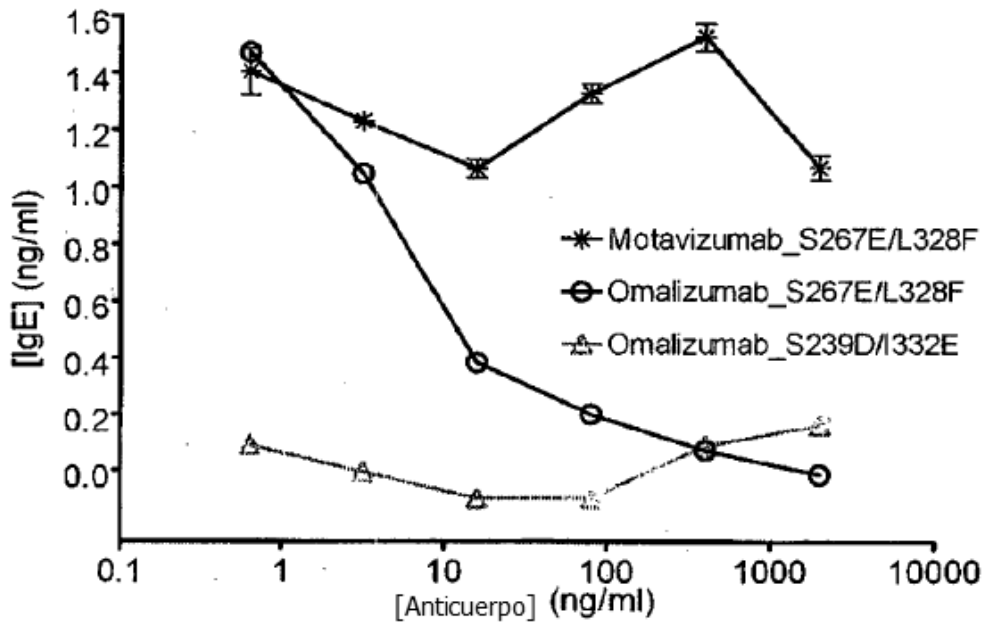


Figura 18

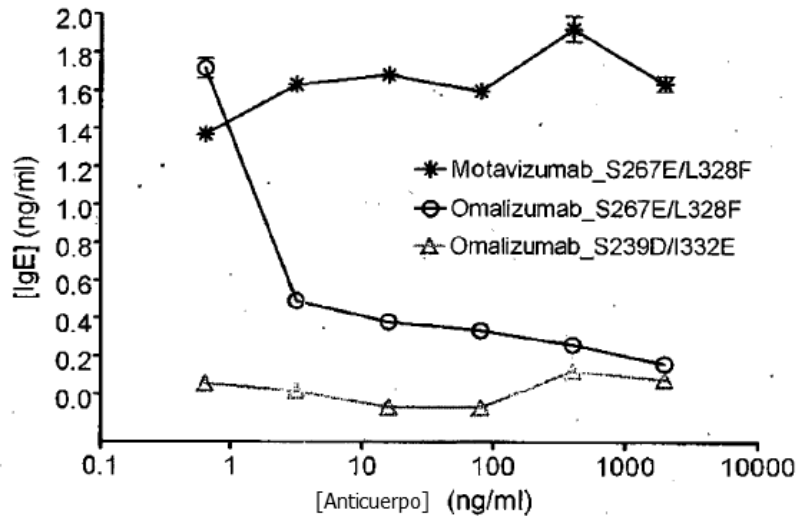


Figura 19

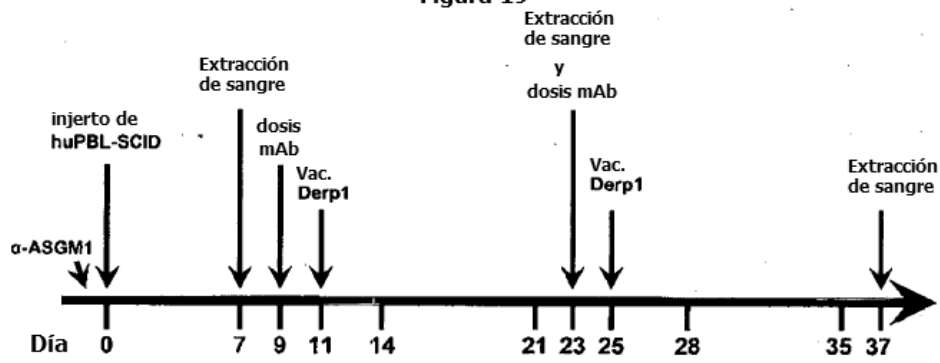


Figura 20

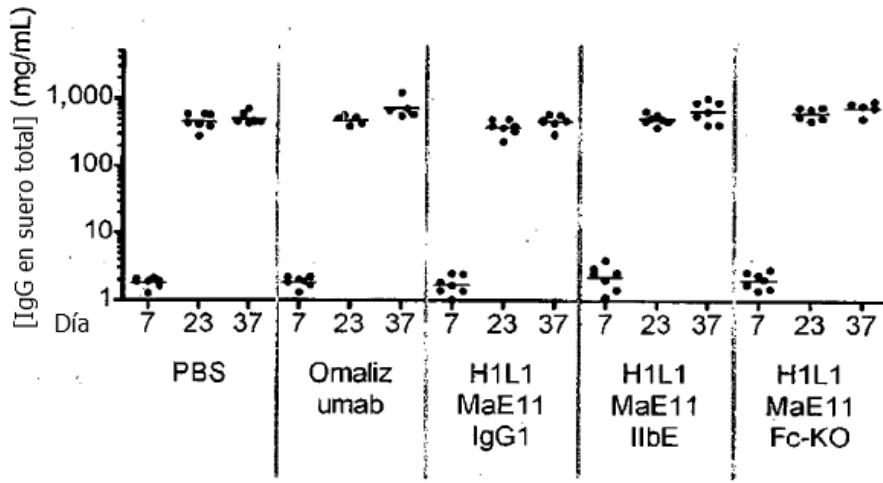


Figura 21

