



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0918670-0 B1



(22) Data do Depósito: 17/09/2009

(45) Data de Concessão: 24/09/2020

(54) Título: ANTICORPO

(51) Int.Cl.: C07K 16/42; A61K 39/395; A61P 37/08.

(30) Prioridade Unionista: 17/09/2008 US 61/097,819.

(73) Titular(es): XENCOR, INC..

(72) Inventor(es): JOHN RUDOLPH DESJARLAIS; SEUNG Y. CHU; HOLLY M. HORTON.

(86) Pedido PCT: PCT US2009057366 de 17/09/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/033736 de 25/03/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/03/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DISORDENS MEDIADAS POR IGE A presente invenção refere-se a imunoglobulinas que se ligam a IgE e FCYRIIb com alta afinidade, tais composições sendo capazes de inibir as células que expressam a IgE ancorada da membrana. Estas composições são úteis para tratar distúrbios mediados por IgE, incluindo alergias e asma.

ANTICORPO

PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório N° de Série U.S. 61/097.819, depositado em 17 de setembro de 2008 sob 35 U.S.C. 119(e) incorporado aqui integralmente por referência, e é relacionado a USSN 12/156.183, depositado em 30 de maio de 2008, denominado “Métodos e Composições para Inibir Células de Expressão de CD32b”, incorporado aqui integralmente por referência.

CAMPO TÉCNICO

A presente divulgação se refere a composições de imunoglobulina que ligam IgE e FcγRIIb com alta afinidade, as referidas composições sendo capazes de inibir células que expressam IgE ancorado por membrana. Tais composições são úteis para tratar distúrbios mediados por IgE, inclusive alergias e asma.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Doenças e condições alérgicas, como asma, rinite alérgica, dermatite atópica, e alergia a alimentos, se tornaram cada vez mais predominantes nas últimas décadas e agora afetam 10 a 40% da população em países industrializados. Doenças alérgicas afetam profundamente a qualidade de vida, e podem causar complicações graves, inclusive morte, como pode ocorrer em casos graves de asma e anafilaxia. As alergias são predominantes, e são a maior causa de afastamento do trabalho e escola e seu impacto na vida pessoal bem como seus custos diretos e indiretos aos sistemas médicos e economia são enormes. Por exemplo, a rinite alérgica (febre do feno) afeta 22% ou mais da população dos EUA, enquanto a asma alérgica afeta pelo menos 20 milhões de residentes dos EUA. O impacto econômico de doenças alérgicas nos Estados Unidos, inclusive custos com assistência médica e perda de produtividade, foram estimados em \$6,4 bilhões no início dos anos noventa.

A maioria das doenças alérgicas são causadas por reações de hipersensibilidade mediada por imunoglobulina E (IgE). A IgE é uma classe de anticorpos geralmente presente no soro em concentrações de minute. É produzida por células de plasma secretoras de IgE que expressam o anticorpo em sua superfície em uma determinada etapa de sua maturidade. Os pacientes alérgicos produzem níveis elevados de IgE com especificidade de ligação para antígenos geralmente inócuos aos quais eles são sensíveis. Estas moléculas de IgE circulam

no sangue e são ligadas a receptores específicos de IgE nas superfícies de basófilos na circulação e mastócitos ao longo de revestimentos de mucosa e sob a pele. A ligação de antígenos ou alérgenos a IgE em mastócitos, basófilos e outros tipos de células, fazem ligação cruzada das moléculas de IgE e agregam os receptores subjacentes, ativando as células para liberarem mediadores estimuladores vasoativos e neuronais como histaminas, leucotrienos, prostaglandinas, bradiquinina, e fator ativador de plaquetas. A reação rápida do sistema imune ao antígeno causada por complexos imunes de anticorpo levou ao termo imediato ou reação de hipersensibilidade mediada por anticorpos, ao contrário de reações de hipersensibilidade mediadas por células ou atrasadas que são mediadas por células T. As reações imunes mediadas por IgE são especificamente referidas como reações de hipersensibilidade do tipo I.

O receptor de alta afinidade para IgE ($Fc\epsilon RI$) é um mediador chave para manifestações alérgicas imediatas. Além de mastócitos e basófilos, os mediadores primários de reações alérgicas, $Fc\epsilon RI$ é encontrado em uma série de outros tipos de células inclusive eosinófilos, plaquetas e em células que contêm antígenos como monócitos e células dendríticas. Um receptor adicional para IgE é $Fc\epsilon RII$, também conhecido como CD23 ou o receptor de IgE Fc de baixa afinidade. $Fc\epsilon RII$ é amplamente expresso em linfócitos B, macrófagos, plaquetas e muitos outros tipos de células como muscular liso de vias aéreas. $Fc\epsilon RII$ pode desempenhar um papel na regulação de feedback de expressão de IgE e subsequentemente expressão de superfície de $Fc\epsilon RII$.

Uma vez que IgE desempenha um papel central na mediação na maioria das reações alérgicas, elaborar tratamentos para controlar níveis de IgE no corpo e regular síntese de IgE tem sido de grande interesse. Diversas estratégias têm sido propostas para tratar doenças alérgicas mediadas por IgE regulando para baixo níveis de IgE. Uma estratégia envolve neutralizar as moléculas de IgE ligando a cadeia- ϵ da IgE em ou próxima ao local de ligação do receptor-Fc. Por exemplo, Omalizumab (Xolair) é um anticorpo anti-IgE monoclonal humanizado recombinante que se liga a IgE no mesmo local de Fc que $Fc\epsilon RI$. Omalizumab causa uma redução no soro total ou IgE circulante em pacientes atópicos, o que atenua a quantidade de IgE específica de antígenos que podem se ligar e sensibilizar mastócitos de tecidos e basófilos. Isto, por sua vez, causa uma diminuição nos sintomas de doenças alérgicas. Interessantemente, níveis de IgE de soro aumentar após o início de terapia devido à formação de complexos de omalizumab-IgE e podem permanecer altos até um ano após a terapia ser interrompida. Por consequência, este tecido

pode levar a negativos falsos em testes diagnósticos e, portanto, os níveis de IgE devem ser verificados com frequência. Consequentemente, há necessidade de métodos e composições melhoradas para reduzir doenças mediadas por IgE e sintomas de doenças.

5 SUMÁRIO DAS MODALIDADES EXEMPLARES

A presente divulgação fornece moléculas de coengate que ligam IgE e Fc γ R1Ib com alta afinidade, composições que compreendem tais moléculas de coengate e métodos de uso de tais novas moléculas de coengate para tratar distúrbios mediados por IgE. As moléculas de coengate da invenção são capazes de inibir células que expressam membrana IgE e Fc γ R1Ib, i.e. células IgE+ Fc γ R1Ib+. As moléculas de coengate da invenção também são preferencialmente capazes de ligar IgE circulante. Os métodos de inibição divulgados aqui compreendem células IgE+ Fc γ R1Ib+ entrando em contato com uma molécula de coengate que coengata IgE e Fc γ R1Ib na superfície da célula.

15 As composições divulgadas aqui incluem moléculas de coengate capazes de coengate IgE e Fc γ R1Ib com alta afinidade na superfície da célula. Em uma modalidade, a molécula de coengate inclui uma imunoglobulina que liga IgE e Fc γ R1Ib com alta afinidade. As moléculas de coengate da invenção, de preferência, coengatam IgE e Fc γ R1Ib ancorados por membrana na superfície de uma célula e, de preferência, são ligadas a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100nM. Em uma modalidade preferencial, a molécula de coengate é uma imunoglobulina e em uma modalidade preferencial adicional, a imunoglobulina é um anticorpo, em que a região de Fv do referido anticorpo especificamente liga IgE. Em uma modalidade preferencial, o referido anticorpo liga ambas IgE circulante e IgE ancorada por membrana. Em modalidades alternadas, o referido anticorpo liga de forma seletiva IgE ancorada por membrana em relação a IgE circulante. Em outra modalidade, a molécula de coengate é um anticorpo biespecífico tendo uma primeira região alvo específica e uma segunda região alvo específica, em que a primeira região alvo específica se liga a IgE e a segunda região alvo específica é ligada a Fc γ R1Ib com um Kd de menos de cerca 100 nM. Em uma modalidade preferencial, a primeira e segunda regiões alvo específicas são regiões Fv, em que a primeira região de Fv se liga a IgE, e a segunda região de Fv é ligada a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Em outra modalidade, a molécula de coengate é uma fusão de Fc que compreende uma região de Fc, em que a referida região de Fc é ligada a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Nesta

modalidade, o parceiro de fusão de Fc da imunoglobulina se liga a IgE.

Em uma modalidade, a molécula de coengate se liga a Fc γ RIIb, em que a afinidade da referida ligação tem um Kd menor do que cerca de 100 nM, e.g., menor ou igual à cerca de 95 nM, menor ou igual à cerca de 90 nM, menor ou igual à cerca de 85 nM, menor ou igual à cerca de 80 nM, menor ou igual à cerca de 75 nM, menor ou igual à cerca de 74 nM.

Em uma modalidade, a molécula de coengate que coengata IgE e Fc γ RIIb com alta afinidade inclui uma variante de imunoglobulina relacionada a uma imunoglobulina principal. Em uma modalidade, a variante de imunoglobulina compreende uma região de Fc variante, em que a referida região de Fc compreende uma ou mais (e.g., duas ou mais) modificações em comparação a uma região de Fc principal, em que a(s) referida(s) modificação(ões) são em posições selecionada do grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 e 332, em que a numeração é de acordo com o índice EU. Em outra modalidade, a(s) modificação(ões) são em posições selecionada do grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acordo com o índice EU. Em outra modalidade, a(s) modificação(ões) são em posições selecionada do grupo que consiste de 235, 236, 266, 267, 268, 328, de acordo com o índice EU. Em outra modalidade, a(s) modificação(ões) são em posições selecionada do grupo que consiste de 235, 236, 239, 266, 267, 268, e 328, de acordo com o índice EU. Em outra modalidade, a(s) modificação(ões) são em posições selecionada do grupo que consiste de 234, 235, 236, 237, 266, 267, 268, 327, 328, de acordo com o índice EU.

Em uma modalidade, a(s) referida(s) modificação(ões) é (são) pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionada do grupo que consiste de 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, e 332E, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, a(s) referida(s) modificação(ões) é (são)

pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionada do grupo que consiste de 234N, 234F, 234D, 234E, 234W, 235Q, 235R, 235W, 235Y, 235D, 235F, 235T, 236D, 236H, 236I, 236L, 236S, 236Y, 236E, 236N, 237H, 237L, 237D, 237N, 239D, 239N, 239E, 266I, 266M, 267A, 267D, 267E, 267G, 268D, 268E, 268N, 268Q, 298E, 298L, 298M, 298Q, 325L, 326A, 326E, 326W, 326D, 327D, 327L, 327E, 328E, 328F, 328Y, 328H, 328I, 328Q, 328W, 330D, 330H, 330K, and 332E, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, a(s) referida(s) modificação(ões) é (são) pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições, etc.) selecionada do grupo que consiste de 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y e 332E, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, as referidas modificações são pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições, etc.) selecionada do grupo que consiste de 234E, 235Y, 235R, 236D, 236N, 237N, 266M, 267E, 268E, 268D, 327D, 327E, 328F, 328Y, 328W, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, as referidas modificações são pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições, etc.) selecionada do grupo que consiste de 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W e 328Y, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, as referidas modificações são pelo menos uma substituição (e.g., uma ou mais substituições, duas ou mais substituições, etc.) selecionada do grupo que consiste de 235Y, 236D, 266M, 267E, 268E, 268D, 328F, 328Y e 328W, em que a numeração é de acordo com um índice EU.

Em uma modalidade, as referidas modificações resultam em pelo menos uma das seguintes combinações de substituições: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 239D/332E, 267E/268D, 267E/268E e 267E/328F, em que a numeração é de acordo com um índice EU.

Em uma modalidade, as modificações divulgadas aqui reduzem a afinidade a pelo menos um receptor relacionado à imunoglobulina principal, em que o referido receptor é selecionado do grupo que consiste de $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$, e $Fc\gamma RIIIa$. Nesta modalidade, as variantes de imunoglobulina divulgadas aqui podem mediar ADCC ou ADCP reduzido relativos à imunoglobulina principal. Em uma modalidade alternativa, as modificações divulgadas aqui aumentam a afinidade a pelo menos um receptor relativo à imunoglobulina principal, em que o referido receptor é

selecionado do grupo que consiste de $Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIa$, e $Fc\gamma RIIIa$. Nesta modalidade, as variantes de imunoglobulina divulgadas aqui podem mediar ADCC ou ADCP aumentado relativos à imunoglobulina principal.

5 Também são divulgados aqui métodos para engenheirar novas moléculas de coengate, inclusive composições de imunoglobulina.

Também são divulgados aqui ácidos nucleicos isolados que codificam moléculas de coengate, inclusive imunoglobulinas descritas aqui. Também são divulgados aqui vetores que compreendem os ácidos nucleicos, opcionalmente, ligados de forma operacional a sequências de controle. Também são divulgadas
10 aqui células hospedeiras que contém os vetores e métodos para produzir e, opcionalmente, recuperar as moléculas de coengate.

Também são descritas aqui moléculas de coengate que compreendem as imunoglobulinas divulgadas aqui. As moléculas de coengate podem ser usadas em um produto terapêutico. Em uma modalidade, as moléculas de coengate divulgadas
15 aqui podem ser anticorpos.

Também são divulgadas aqui composições que compreende as moléculas de coengate divulgadas aqui, e um transportador ou diluente fisiologicamente ou farmacologicamente aceitável.

Também são divulgados aqui métodos para inibir células $IgE+$ $Fc\gamma RIIb+$. Os
20 métodos de inibição de células descritos aqui compreendem o contato de uma célula $IgE+$ $Fc\gamma RIIb+$ com uma molécula de coengate, em que a referida molécula de coengate é ligada a $Fc\gamma RIIb$ com um Kd e menos de cerca de 100 nM. Na maioria das modalidades preferenciais, a referida molécula de coengate coengata IgE e $Fc\gamma RIIb$ na superfície da célula. Em modalidades preferenciais, os métodos
25 de inibição compreende o contato de uma célula $IgE+$ $Fc\gamma RIIb+$ com um anticorpo, em que o referido anticorpo é ligado a IgE através de sua região de Fv , e em que o referido anticorpo compreende uma região de Fc , em que a referida região de Fc é ligada a $Fc\gamma RIIb$ com Kd de 100 nM ou menor. Em outras modalidades, a região de Fc é ligada a $Fc\gamma RIIa$ e/ou $Fc\gamma RIIIa$ com afinidade que é maior em relação a $IgG1$
30 nativo. Em outras modalidades, os métodos compreendem o contato de células $IgE+$ $Fc\gamma RIIb+$ com uma molécula de coengate, em que a referida molécula de coengate é um anticorpo biespecífico que compreende uma primeira região de Fv e uma segunda região de Fv , em que a referida primeira região de Fv é ligada a IgE , e a referida segunda região de Fv é ligada a $Fc\gamma RIIb$ com um Kd menor do que
35 cerca de 100 nM. Em modalidades alternativas, os métodos compreendem o

contato de células IgE+ Fc γ R1Ib+ com uma molécula de coengate, em que a referida molécula de coengate é uma fusão de Fc que compreende uma região de Fc, em que a referida região de Fc é ligada a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM.

5 Outros métodos preferenciais incluem um método de redução de secreção de IgE. O método inclui o contato de uma célula IgE+ Fc γ R1Ib+ com uma molécula de coengate, em que a referida molécula de coengate é ligada a IgE e Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM.

10 Também é incluído um método de inibição de maturação de células B. Este método inclui contato de uma célula IgE+ Fc γ R1Ib+ com uma molécula de coengate, em que a referida molécula de coengate é ligada a IgE e Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM.

15 Também são descritos usos terapêuticos e diagnósticos para as moléculas de coengate divulgadas aqui. Em uma modalidade preferencial, as moléculas de coengate divulgadas aqui são usadas para tratar um ou mais distúrbios mediados por IgE, e.g., doenças autoimunes, doenças inflamatórias etc. que são mediadas por imunoglobulina IgE. Em modalidades específicas, distúrbios alérgicos e atópicos que podem ser tratados pelas composições divulgadas aqui incluem, entre outros, asma alérgica e atópica, dermatite atópica e eczema, rinite alérgica, conjuntivite
20 alérgica e rinoconjuntivite, encefalomielite alérgica, vasculite alérgica, choque anafilático e alergias a qualquer variedade de alergias ao ambiente ou alimentos. Os métodos de tratamento divulgados aqui compreendem a administração a um paciente em necessidade de tal, de uma quantidade terapêutica de uma molécula de coengate que coengata IgE e Fc γ R1Ib na superfície de uma célula.

25 BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Ilustração da nova abordagem mecanística para inibir células IgE+ Fc γ R1Ib+ B. Sob estímulos apropriados, células B virgens podem se diferenciar em células IgE+ B. O coengate de antígenos com o receptor celular de IgE B ativa estas células, que podem em seguida se diferenciar em células de plasma que liberam
30 IgE circulante. A ligação de IgE circulante é ligada a Fc ϵ R's, por exemplo e mastócitos, basófilos e eosinófilos ativam estas células. A liberação de histamina, prostaglandinas, e outros mediadores químicos por fim resulta nos sintomas clínicos de alergia e asma. Omalizumab, tendo uma região de Fc de IgG1nativo, é capaz de bloquear a ligação de IgE a Fc ϵ R. Anticorpos anti-IgE com alta afinidade para
35 Fc γ R1Ib, referidos como Anti-IgE-IIbE na figura, são capazes de não só bloquear a

ligação de IgE a FcεR, mas também de inibir a ativação de células IgE+ B por coengate de mIgE FcγRIIb.

Figura 2. Sensogramas de ressonância de plásmon em superfície Biacore que mostram a ligação de anticorpos anti-CD19 variantes de Fc a FcγRIIb humano.

5 Figura 3. Afinidades de anticorpos variantes de Fc para FcγRs humano como determinado por Biacore. O gráfico mostra o $\log(K_A)$ para ligação de anticorpos variantes e WT IgG1 human FcγRI (I), H131 FcγRIIa (H IIa), FcγRIIb (IIb), e V158 FcγRIIIa (V IIIa) humanos. A ligação de G236D/S267E e S267E/L328F a V158 FcγRIIIa não foi detectada. A ligação de G236R/L328R (Fc-KO) a todos os
10 receptores testados não foi detectada.

Figura 4. Afinidades de anticorpos variantes de Fc para FcγRs humano como determinado pela ressonância de plásmon de superfície Biacore. A tabela fornece equilíbrio K_D 's para ligação de anticorpos variantes e WT IgG1 FcγRI, H131 FcγRIIa FcγRIIb, e V158 FcγRIIIa humanos, e a ligação dobradiçada para cada um em
15 relação a (WT) IgG1 nativo. n.d. = não detectável.

Figura 5. Sequências de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e leve (VL) e CDRs de anticorpos anti-IgE. Os limites de CDR foram definidos anteriormente com base em um alinhamento estrutural de regiões variáveis de anticorpos (Lazar *et al.*, 2007, Mol Immunol 44:1986-1998).

20 Figura 6. Sequências de aminoácidos das cadeias pesada e leve WT e regiões constants de variantes.

Figura 7. Sequências de aminoácidos de anticorpos de comprimento total anti-IgE que podem ser usados para alvejar células IgE+ B.

25 Figura 8. Tabela de dados de afinidade para ligação de WT e anticorpos anti-IgE variantes à região de Fc de IgE e FcγRIIb.

Figura 9. Plotagem de dados de afinidade para ligação de WT e anticorpos anti-IgE variantes à região de Fc de IgE FcγRIIb.

Figura 10. IgE ELISA usando anticorpos anti-IgE comerciais (MabTech) e feitos no próprio laboratório (Omalizumab e MaE11) como reagentes de captura.

30 Figura 11. A região variável do anticorpo anti-IgE omalizumab não compete com o anticorpo de captura MabTech para detecção de IgE no protocolo ELISA.

Figura 12. Inibição de células IgE+ B com classe alterada com anticorpos anti-IgE variantes aprimorados por afinidade de FcγRIIb, mas não anticorpos

desprovidos de ligação a Fc γ R (G236R/L328R variante de Fc) ou desprovidos de ligação a IgE (motavizumab). A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 12 dias de incubação com IL-4, anticorpo agonista anti-CD40 (α -CD40), e concentrações variantes dos anticorpos mostrados.

5 Figura 13. Anticorpos anti-IgE variantes não inibem células IgG2+ B com classe alterada. A plotagem mostra a concentração de IgG2 liberado de PBMCs após 12 dias de incubação com IL-4, α -CD40, e concentrações variantes dos anticorpos mostrados.

10 Figura 14. Inibição de células IgE + B com classe alterada com anticorpos anti-IgE variantes aprimorados para afinidade com Fc γ R11b. A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 14 dias de incubação com IL-4, anticorpo agonista anti-CD40 (α -CD40), e concentrações variantes dos anticorpos mostrados. Os dados foram normalizados à menor concentração do anticorpo.

15 Figura 15. Inibição de células IgE+B com classe alterada com anticorpos anti-IgE variantes aprimorados para afinidade com Fc γ R11b. A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 14 dias de incubação com anticorpo agonista IL-4, anti-CD40 (α -CD40), anticorpo de ligação cruzada anti-CD79b BCR, e concentrações variantes dos anticorpos mostrados. Os dados foram normalizados à menor concentração do anticorpo.

20 Figura 16. Inibição de células IgE + B com classe alterada com anticorpos anti-IgE variantes aprimorados para afinidade com Fc γ R11b. A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 14 dias de incubação com anticorpo agonista IL-4, anti-CD40 (α -CD40), anticorpo de ligação cruzada anti-mu BCR, e concentrações variantes dos anticorpos mostrados. Os dados foram normalizados à
25 menor concentração do anticorpo.

30 Figura 17. Inibição de células IgE+B com classe alterada com função efetora de ADCC e ADCP aprimorada por anticorpos anti-IgE variantes. A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 14 dias de incubação com anticorpo agonista IL-4, anti-CD40 (α -CD40), anticorpo de ligação cruzada anti-CD79b BCR, e concentrações variantes dos anticorpos mostrados.

Figura 18. Inibição de células IgE + B com classe alterada com função efetora de ADCC e ADCP aprimorada por anticorpos anti-IgE variantes. A plotagem mostra a concentração de IgE liberada de PBMCs após 14 dias de incubação com anticorpo agonista IL-4, anti-CD40 (α -CD40), anticorpo de ligação cruzada anti-mu

BCR e concentrações variantes dos anticorpos.

Figura 19. Protocolo para estudo *in vivo* de huPBL-SCID para testar a atividade de anticorpos anti-IgE. Os dias indicados refletem o número de dias após o enxerto de PBMCs de um doador que obteve teste positivo para anticorpos IgE específicos para Der p 1. A vacina com Der p 1 indica vacinação com antígeno Der p 1.

Figura 20. Níveis totais de IgG sérica a partir do modelo *in vivo* huPBL-SCID para cada grupo de tratamento. Os dias indicados (7, 23, e 37) refletem as representações sanguíneas delineadas no protocolo da Figura 19. PBS indica o grupo de veículo não tratado, Omalizumab indica o grupo tratado com Omalizumab IgG1, e os grupos 3 H1L1 MaE11 indicam grupos tratados com MaE11 humanizado compreendendo uma variante WT IgG1 (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE), ou região de Fc G236R/L328R (Fc-KO).

Figura 21. Níveis totais de IgE sérica a partir do modelo *in vivo* huPBL-SCID para cada grupo de tratamento. Os dias indicados (7, 23, e 37) refletem as representações sanguíneas delineadas no protocolo da Figura 19. PBS indica o grupo de veículo não tratado, Omalizumab indica o grupo tratado com Omalizumab_IgG1, e os grupos 3 H1L1 MaE11 indicam grupos tratados com MaE11 humanizado compreendendo uma variante WT IgG1 (IgG1), variante S267E/L328F (IIbE), ou região de Fc G236R/L328R (Fc-KO). O limite de quantificação para o método ELISA foi 31,6 ng/mL; as amostras que estavam abaixo deste limite foram reportadas como 31,6 ng/mL na plotagem.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES EXEMPLARES

São descritas aqui moléculas de coengate que imitam os efeitos inibidores de coengate de IgE ancorada por membrana com Fc γ RIIb em células B. Por exemplo, são descritos aqui anticorpos anti-IgE variantes engenheirados de modo que o domínio de Fc seja ligado a Fc γ RIIb com até ~430 vezes mais afinidade. Com relação a IgG1 nativo, as variantes aprimoradas por ligação com Fc γ RIIb (IIbE) inibem de forma intensa a mobilização e viabilidade de cálcio induzidas por BCR em células IgE⁺ B humanas primárias. O uso de uma única molécula, como um anticorpo para suprimir as funções da célula B através de coengate do cognato IgE BCR e Fc γ RIIb pode representar uma nova abordagem no tratamento de doenças mediadas por IgE. Exemplos não limitadores de doenças mediadas por IgE incluem respostas alérgicas e asma e são descritos mais detalhadamente abaixo.

Moléculas de coengate de acordo com a divulgação podem tomar uma variedade de configurações conforme descrito mais detalhadamente abaixo. Em uma modalidade, a molécula de coengate inclui uma imunoglobulina que liga IgE e Fc γ R11b com alta afinidade. Nesta modalidade, a imunoglobulina, de preferência, coengata IgE ancorada por membrana e Fc γ R11b na superfície de uma célula e faz ligação com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Em outra modalidade, a molécula de coengate é uma molécula biespecífica tendo uma primeira região alvo específica e uma segunda região alvo específica, em que a primeira região alvo específica é ligada a IgE e a segunda região alvo específica é ligada a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM, embora em algumas modalidades possa se ligar a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 10 nM ou um Kd menor do que cerca de 1 nM e em algumas modalidades a ligação pode ocorrer com um Kd menor do que 100 pM. Em uma modalidade preferencial, a molécula de coengate é um anticorpo biespecífico e a primeira e segunda regiões alvo específicas são regiões de Fv, em que a primeira região de Fv se liga a IgE, e a segunda região de Fv se liga a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Em outra modalidade, a molécula de coengate é uma fusão de Fc que compreende uma região de Fc, em que a referida região de Fc se liga a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Nesta modalidade, o parceiro de fusão de Fc da imunoglobulina se liga a IgE.

São descritas aqui diversas definições. Tais definições incluem os equivalentes gramaticais.

"ADCC" ou "citotoxicidade mediada por célula dependente de anticorpo" conforme aqui empregado significa a reação mediada por célula em que células citotóxicas não específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e, subsequentemente, causam lise da célula alvo.

"ADCP" ou "fagocitose mediada por célula dependente de anticorpo" conforme aqui empregado significa a reação mediada por célula em que células citotóxicas não específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e, subsequentemente, causam a fagocitose da célula alvo.

"Modificação de aminoácidos" conforme aqui empregado significa uma substituição, inserção e/ou deleção de aminoácidos em uma sequência de polipeptídeos. "Substituição de aminoácidos" ou "substituição" significa aqui a substituição de um aminoácido em uma posição específica em uma sequência de polipeptídeos principal com outro aminoácido. Por exemplo, a substituição S267E se

refere a um polipeptídeo variante, neste caso uma variante de cadeia pesada constante, em que a serina na posição 267 é substituída por ácido glutâmico. “Inserção de aminoácidos” ou “inserção” conforme aqui empregado, significa a adição de um aminoácido em uma posição específica em uma sequência de polipeptídeos principal. “Deleção de aminoácidos” ou “deleção” conforme aqui empregado significa a remoção de um aminoácido em uma posição específica em uma sequência de polipeptídeos principal.

Anticorpo significa aqui uma proteína que consiste de um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por todos ou parte dos genes de imunoglobulina reconhecidos. Os genes de imunoglobulina reconhecidos, por exemplo, incluem kappa (κ), lambda (λ), e locais genéticos de cadeia pesada, que juntos compreende os genes de região variável miríade, e os genes de região constante mu (μ), delta (δ), gama (γ), sigma (σ), e alfa (α) que codificam os isótipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2), respectivamente. Anticorpo aqui destina-se a inclui anticorpos de comprimento total e fragmentos de anticorpos, e pode se referir a um anticorpo natural de qualquer organismo, um anticorpo engenheirado, ou um anticorpo gerado de forma recombinante para fins experimentais, terapêuticos ou outros fins.

“Aminoácido” e “identidade de aminoácidos” conforme aqui empregado significa um dos 20 aminoácidos de ocorrência natural ou quaisquer análogos não-naturais que podem estar presentes em uma posição específica, definida.

“Célula CD32b+” ou “célula Fc γ RIIb+” conforme empregado aqui significa qualquer célula ou tipo de célula que expresse CD32b (Fc γ RIIb). Células CD32b+ incluem, entre outros, células B, células de plasma, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, basófilos ou eosinófilos.

“Célula IgE+” conforme empregado aqui significa qualquer célula ou qualquer tipo de célula que expresse IgE. Em modalidades preferenciais da invenção, células IgE+ expressam IgE ancorada por membrana (mIgE). Células IgE+ incluem, entre outros, células B e células de plasma.

“CDC” ou “citotoxicidade dependente de complemento” conforme empregado aqui significa a reação em que um ou mais componentes de proteína complementar reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e, subsequentemente, causam lise da célula alvo.

“Molécula de coengate” ou “equivalentes gramaticais” significa uma molécula

bifuncional capaz de ligar ambos IgE e Fc γ RIIb em que o Kd para a ligação da molécula ao Fc γ RIIb é menor do que cerca de 100 nM em uma superfície celular resultante em ligação simultânea de ambos IgE e Fc γ RIIb.

5 “Região constante” de um anticorpo conforme empregado aqui significa a região do anticorpo que é codificada por um dos genes de região constante de imunoglobulina de cadeia leve ou pesada. “Cadeia leve constante” ou “região constante de cadeia leve” conforme empregado aqui significa a região de um anticorpo codificada pelas cadeias leves kappa (C κ) ou lambda (C λ). A cadeia leve constante tipicamente compreende um único domínio, e conforme definida aqui se
10 refere às posições 108-214 de C κ ou C λ , em que a numeração é de acordo com o índice EU. “Cadeia pesada constante” ou “região de constante de cadeia pesada” conforme empregado aqui significa a região de um anticorpo codificada pelos genes mu, delta, gama, alfa, ou ípsilon para definir o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, ou IgE, respectivamente. Para anticorpos IgG de comprimento total, a
15 cadeia pesada constante, conforme definido aqui, se refere ao terminal-N do domínio CH1 ao terminal-C do domínio CH3, compreendendo assim as posições 118 a 447, em que a numeração é de acordo com o índice EU.

“Função efetora” conforme empregado aqui significa um evento bioquímico causado pela região de Fc do anticorpo com um receptor ou ligante de Fc. As
20 funções efetoras incluem funções efetoras mediadas por Fc γ R como ADCC e ADCP, e funções efetoras mediadas por complemento como CDC.

“Célula efetora”, conforme empregada aqui significa uma célula do sistema imune que expressa um ou mais receptores complementares e/ou de Fc e media uma ou mais funções efetoras. As células efetoras incluem, entre outros, monócitos,
25 macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastócitos, plaquetas, células B, linfócitos grandes granulares, células de Langerhans, células *natural killers* (NK), e células $\gamma\delta$ T, e podem ser de qualquer organismo inclusive, entre outros, humanos, camundongos, ratos, coelhos e macacos.

“Fab” ou “região de Fab” conforme empregado aqui significa os polipeptídeos
30 que compreendem os domínios de imunoglobulina V_H, CH1, V_H, e C_L. Fab pode se referir a esta região isolada, ou esta região no contexto de um anticorpo de comprimento total ou fragmento de anticorpo.

“Fc” ou “região de Fc”, conforme empregado aqui significa o polipeptídeo que compreende a região constante de um anticorpo com exceção do primeiro domínio
35 de região constante e em alguns casos, parte da dobradiça. Assim, Fc se refere aos

dois últimos domínios de imunoglobulina de região constante de IgA, IgD e IgG, e os três últimos domínios de imunoglobulina de região constante de IgE e IgM, e o terminal-N de dobradiça flexível a estes domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende os domínios de imunoglobulina Cgamma2 e Cgamma3 (C γ 2 e C γ 3) e a dobradiça entre Cgamma1 (C γ 1) e Cgamma2 (C γ 2). Embora os limites da região de Fc possam variar, a região de Fc de cadeia pesada de IgG humana é geralmente definida de modo a compreender resíduos C226 ou P230 em seu terminal-carboxila, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Fc pode se referir a esta região isolada, ou esta região no contexto de um polipeptídeo de Fc, conforme descrito abaixo.

"Polipeptídeo Fc" conforme empregado aqui significa um polipeptídeo que compreende toda ou parte de uma região de Fc. Polipeptídeos de Fc incluem anticorpos, fusões de Fc, Fcs isolados e fragmentos de Fc. Imunoglobulinas pode ser polipeptídeos de Fc.

"Fusão de Fc" conforme empregado aqui significa uma proteína em que um ou mais polipeptídeos são ligados de forma operacional a Fc. Fusão de Fc, aqui, deve ser sinônimo dos termos "imunoadesina", "fusão de Ig", "quimera de Ig" e "globulina receptora" (às vezes com traços) conforme empregado no estado da técnica (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200, ambos empregados aqui integralmente por referência). Uma fusão de Fc combina a região de Fc de uma imunoglobulina com um parceiro de fusão, que no geral pode ser qualquer proteína, polipeptídeo ou molécula pequena. O papepl da parte não-Fc de uma fusão de Fc, i.e., o parceiro de fusão, é media a ligação alvo, e assim é funcionalmente análogo às regiões variáveis de um anticorpo. Praticamente qualquer proteína ou molécula pequena pode ser ligada a Fc para gerar uma fusão de Fc. Os parceiros de fusão de proteína podem incluir, entre outros, a reigão de ligação alvo de um receptor, uma molécula de adesão, um ligante, uma enzima, uma citosina, uma quemoquina ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. Parceiroa de fusão de moléculas pequenas podem incluir um agente terapêutico que direciona a fusão de Fc a um alvo terapêutico. Tais alvos podem ser qualquer molécula, e.g., um receptor extracelular que é implicado na doença.

"Receptor gama de Fc" ou "Fc γ R" conforme empregado aqui significa qualquer membro da família de proteínas que se liga à região de Fc do anticorpo IgG e são substancialmente codificados pelos genes Fc γ R. Em humanos, esta

família inclui, entre outros, Fc γ RI (CD64), inclusive isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, e Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), inclusive isoformas Fc γ RIIa (inclusive alótipos H131 and R131), Fc γ RIIb (inclusive Fc γ RIIb-1 e Fc γ RIIb-2), e Fc γ RIIc; e Fc γ RIII (CD16), inclusive isoformas Fc γ RIIIa (inclusive alótipos V158 e F158) e Fc γ RIIIb (inclusive alótipos Fc γ RIIIb-NA1 e Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65, incorporado aqui integralmente por referência), bem como quaisquer isoformas ou alótipos Fc γ Rs or Fc γ R) humanos. Um Fc γ R pode ser proveniente de qualquer organismo, inclusive, entre outros, humanos, camundogos, ratos, coelhos e macacos. Fc γ Rs de camundongo incluem, entre outros, Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32), Fc γ RIII (CD16), e Fc γ RIII-2 (CD16-2), bem como quaisquer isoformas ou alótipos Fc γ Rs ou Fc γ R de camundongo não descobertos.

“Ligante de Fc” ou “receptor de Fc” conforme empregado aqui significa uma molécula, e.g, um polipeptídeo, de qualquer organismo que se liga à região de Fc de um anticorpo para formar um complexo de ligante de Fc. Ligantes de Fc incluem, entre outros, Fc γ Rs, Fc γ Rs, Fc γ Rs, FcRn, C1q, C3, lectina ligante de manana, receptor de manose, proteína A *staphylococcal*, proteína G *streptococcal* e Fc γ R viral. Ligantes de Fc também incluem homólogos de receptores de Fc (FcRH), que são uma família de receptores de Fc que são homólogos aos Fc γ Rs (Davis *et al.*, 2002, *Immunological Reviews* 190:123-136). Ligantes de Fc podem incluir moléculas não descobertas que se ligam à Fc.

“Anticorpo de comprimento total” conforme empregado aqui significa a estrutura que constitui a forma biológica natural de um anticorpo, inclusive regiões variáveis e constantes. Por exemplo, na maioria dos mamíferos, inclusive humanos e camundongos, o anticorpo de comprimento total do isótipo de IgG é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de duas cadeias de imunoglobulina, cada par tendo uma cadeia leve e uma cadeia pesada, cada cadeia leve compreendendo domínios de imunoglobulina VL e CL, e cada cadeia pesada compreendendo domínios de imunoglobulina VH, C γ 1, C γ 2, e C γ 3. Em alguns mamíferos, por exemplo em camelos e lhamas, anticorpos de IgG podem consistir de apenas duas cadeias pesadas, cada cadeia pesada compreendendo um domínio variável ligado à região de Fc.

“Imunoglobulina” significa uma proteína que compreende um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados por genes de imunoglobulina. Imunoglobulinas incluem, entre outros, anticorpos (inclusive anticorpos biespecíficos) e fusões de Fc. Imunoglobulinas podem ter uma série de formas

estruturais, inclusive, entre outros, anticorpos de comprimento total, fragmentos de anticorpos e domínios de imunoglobulina individuais.

5 “Domínio de imunoglobulina (Ig)” significa uma região de uma imunoglobulina que existe como uma entidade estrutural distinta como verificado por aqueles versados na técnica de estrutura de proteínas. Domínios de Ig tipicamente tem uma topologia de dobradiça de sanduíche- β característica. Os domínios de Ig conhecidos no isótipo de IgG de anticorpos são VH C γ 1, C γ 2, C γ 3, VL e CL.

10 “IgG” ou “imunoglobulina IgG” ou “imunoglobulina G” conforme empregado aqui significa um polipeptídeo que pertence à classe de anticorpos que são substancialmente codificados por um gene gama de imunoglobulina reconhecida. Em humanos, esta classe compreende a subclasse ou isótipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

15 “IgE” ou “imunoglobulina IgE ” ou “imunoglobulina E” conforme empregado aqui significa um polipeptídeo que pertence à classe de anticorpos que são substancialmente codificados por um gene ípsilon de imunoglobulina reconhecida. IgE pode ser ancorada por membrana (mIgE), ou não ancorada por membrana, também referida aqui como IgE circulante.

“Inibição” de células ou equivalentes gramaticais significam prevenir ou reduzir a ativação, proliferação, maturidade ou diferenciação de células alvejadas.

20 “Isótipo” conforme empregado aqui significa qualquer uma das subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características químicas e antigênicas de suas regiões constantes. Os isótipos de imunoglobulina humana conhecidos são IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD e IgE.

25 “Modificação” conforme empregado aqui significa uma alteração nas propriedades físicas, químicas ou de sequência de uma proteína, polipeptídeo, anticorpo ou imunoglobulina. As modificações descritas aqui incluem modificações de aminoácidos e modificações de glicoformos.

30 “Modificação de glicoformos” ou “glicoformo modificado” ou “glicoformo engenheirado” conforme empregado aqui significa uma composição de carboidrato que é ligada de forma covalente a uma proteína, por exemplo, um anticorpo, em que a referida composição do carboidrato difere quimicamente daquela de uma proteína principal. Um glicoformo modificado geralmente se refere ao carboidrato ou oligossacarídeo diferente; assim, por exemplo, uma variante de Fc pode compreender um glicoformo modificado. Como alternativa, o glicoformo modificado

por se referir à variante de Fc que compreende o carboidrato ou oligossacarídeo diferente.

“Polipeptídeo principal”, “proteína principal”, “imunoglobulina principal”, “polipeptídeo precursor”, “proteína precursora” ou “imunoglobulina precursora”
5 conforme empregado aqui significa um polipeptídeo, proteína ou imunoglobulina não modificada que é subseqüentemente modificada para gerar uma variante, e.g., qualquer polipeptídeo, proteína ou imunoglobulina que sirva como um modelo e/ou base para pelo menos uma modificação de aminoácido descrita aqui. O polipeptídeo principal pode ser um polipeptídeo de ocorrência natural, ou uma versão variante ou
10 engenheirada de um polipeptídeo de ocorrência natural. O polipeptídeo principal pode ser referir ao próprio polipeptídeo, composições que compreendem o polipeptídeo principal, ou a sequência de aminoácidos que o codificam. Conseqüentemente, “polipeptídeo de Fc principal” conforme empregado aqui significa um polipeptídeo de Fc que é modificado para gerar um polipeptídeo de Fc
15 variante, e “anticorpo principal” conforme empregado aqui significa um anticorpo que é modificado para gerar um anticorpo variante (e.g., um anticorpo principal pode incluir, entre outros, uma proteína que compreende a região constante de uma Ig de ocorrência natural).

“Posição” conforme empregado aqui significa um local na sequência de uma
20 proteína. As posições podem ser numeradas sequencialmente ou de acordo com um formato estabelecido; por exemplo, o índice EU como descrito em Kabat. Por exemplo, a posição 297 é uma posição no anticorpo humano IgG1.

“Polipeptídeo” ou “proteína” conforme empregado aqui significa pelo menos dois aminoácidos ligados de forma covalente, o que inclui proteínas, polipeptídeos,
25 oligopeptídeos e peptídeos.

“Resíduo” conforme empregado aqui significa uma posição em uma proteína e sua identidade de aminoácido associada. Por exemplo, Asparagina 297 (também denominada Asn297, também denominada N297) é um resíduo no anticorpo humano IgG1.

30 “Antígeno alvo” conforme empregado aqui significa a molécula que é ligada pela região variável de um determinado anticorpo, ou o parceiro de fusão de uma fusão de Fc. Um antígeno alvo pode ser uma proteína, carboidrato, lipídeo ou outro composto químico. Um anticorpo ou fusão de Fc é considerado “específico” para um determinado antígeno alvo com base em ter afinidade para o antígeno alvo.

“Célula alvo” significa uma célula que expressa um antígeno alvo.

“Região variável” conforme empregado aqui significa a região de uma imunoglobulina que compreende um ou mais domínios de Ig substancialmente codificados por qualquer um dentre os genes de $V\kappa$, $V\lambda$, e/ou VH que compõem o kappa, lambda locais genéticos de imunoglobulina de cadeia pesada, respectivamente.

“Polipeptídeo variante”, “polipeptídeo variante”, ou “variante” conforme empregado aqui significa uma sequência de polipeptídeos que difere daquela de uma sequência de polipeptídeos principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. O polipeptídeo principal pode ser um polipeptídeo de ocorrência natural ou do tipo selvagem (WT), ou pode ser uma versão modificada de um polipeptídeo do tipo selvagem. Polipeptídeo variante podem se referir ao polipeptídeo em si, a uma composição que compreende o polipeptídeo, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. Em algumas modalidades, os polipeptídeos variantes divulgados aqui (e.g., imunoglobulinas variantes) podem ter pelo menos uma modificação de aminoácido em comparação ao polipeptídeo principal, e.g. de cerca de uma a dez modificações de aminoácidos, de cerca de uma a cinco modificações de aminoácidos, etc. em comparação ao polipeptídeo principal. A sequência de polipeptídeos variantes aqui pode ter pelo menos cerca de 80% de homologia com uma sequência de polipeptídeos principal, e.g. pelo menos cerca de 90% de homologia, 95% de homologia, etc. Consequentemente, “variante de Fc” ou “Fc variante” conforme empregado aqui significa uma sequência de Fc que difere daquela de uma sequência de Fc principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. Uma variante de Fc pode englobar somente uma região de Fc, ou pode existir no contexto de um anticorpo, fusão de Fc, Fc isolado, fragmento de Fc ou outro polipeptídeo que é substancialmente codificado por Fc. A variante de Fc pode ser referir ao próprio polipeptídeo de Fc, composições que compreendem o polipeptídeo de variante de Fc, ou a sequência de aminoácidos que o codifica. “Variante de polipeptídeo Fc” ou “polipeptídeo Fc variante” conforme empregado aqui significa um polipeptídeo Fc que difere de um polipeptídeo Fc principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. “Variante de proteína” ou “proteína variante” conforme empregado aqui significa uma proteína que difere de uma proteína principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. “Variante de anticorpo” ou “anticorpo variante” conforme empregado aqui significa um anticorpo que difere de um anticorpo principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. “Variante de IgG” ou “IgG variante”

conforme empregado aqui significa um anticorpo que difere de uma IgG principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. “Variante de imunoglobulina” ou “imunoglobulina variante” conforme empregado aqui significa uma sequência de imunoglobulinas que difere daquela de uma sequência de imunoglobulinas principal em virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido.

“Tipo selvagem” ou “WT” aqui significa uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que é encontrada na natureza, inclusive variações alélicas. Uma proteína, polipeptídeo, anticorpo, imunoglobulina, IgG WT, etc. tem uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de nucleotídeos que não foi modificada de forma intencional.

Moléculas de Coengate

Conforme descrito aqui moléculas de coengate são moléculas bifuncionais capazes de se ligar a Fc γ R11b e IgE na superfície de uma célula. Estas moléculas podem tomar uma variedade de configurações conforme descrito mais detalhadamente aqui. De preferência, as moléculas de coengate são proteináceas, embora isto não seja necessariamente exigido. Em algumas modalidades, a molécula de coengate pode ser uma molécula bifuncional na qual a especificidade para Fc γ R11b e/ou IgE é conferida por uma molécula pequena, ácido nucléico e/ou polipeptídeo, por exemplo. De preferência, a molécula de coengate se liga a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Em uma modalidade preferencial, a molécula de coengate inclui uma imunoglobulina que se liga a IgE e Fc γ R11b com alta afinidade. Nesta modalidade, a imunoglobulina, de preferência, coengata a IgE ancorada por membrana e Fc γ R11b na superfície de uma célula. Em outra modalidade, a molécula de coengate é uma molécula biespecífica tendo uma primeira região específica alvo e uma segunda região específica alvo, em que a primeira região específica alvo se liga a IgE e a segunda região específica alvo se liga a Fc γ R11b com um Kd menor que cerca de 100 nM. Em uma modalidade preferencial, a molécula de coengate é um anticorpo biespecífico e a primeira e segunda regiões alvo específicas são regiões de Fv, em que a primeira região de Fv se liga a IgE, e a segunda região de Fv se liga a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Em outra modalidade, a molécula de coengate é uma fusão de Fc que compreende uma região de Fc, em que a referida região de Fc se liga a Fc γ R11b com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Nesta modalidade, o parceiro de fusão de Fc da imunoglobulina se liga a IgE.

Em uma modalidade, a molécula de coengate é uma molécula bifuncional em que uma primeira região se liga a IgE e uma segunda região se liga a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Praticamente qualquer proteína, molécula pequena ou ácido nucléico, e.g. aptâmeros, podem ser ligados para gerar a molécula de ligação bifuncional e podem incluir ligantes como definido aqui. Em uma modalidade preferencial, os parceiros de fusão de proteínas podem incluir, entre outros, a região variável de um anticorpo, a região de ligação alvo de um receptor, uma molécula de adesão, um ligante, uma enzima, uma citosina, uma quemoquina, ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. Os parceiros de fusão de moléculas pequenas podem incluir qualquer agente que direcione a molécula de coengate a um antígeno alvo, como IgE. Por exemplo, em modalidades preferenciais, a molécula de coengate pode compreender Fc ϵ R1 ou Fc ϵ R2/CD23 como um parceiro de fusão. Em modalidades preferenciais, as imunoglobulinas são usadas como moléculas de coengate.

15 Imunoglobulinas

Como descrito aqui, uma imunoglobulina é um componente preferencial de uma molécula de coengate e pode ser um anticorpo, uma fusão de Fc, um Fc isolado, um fragmento de Fc ou um polipeptídeo de Fc. Em uma modalidade, uma imunoglobulina é um anticorpo. Como descrito mais detalhadamente abaixo, a imunoglobulina é usada como molécula bifuncional em que a região de Fv se liga a IgE e a região de Fc se liga a Fc γ R1Ib com um Kd menor do que cerca de 100 nM. Além disso, um anticorpo é usado em fusões de Fc ou anticorpos bifuncionais conforme descrito abaixo.

Anticorpos são proteínas imunológicas que se ligam a um antígeno específico. Na maioria dos mamíferos, inclusive humanos e camundongos, os anticorpos são construídos a partir de cadeias de polipeptídeos pesada e leve emparelhadas. As regiões variáveis de cadeia leve e pesada mostram diversidade de sequência significativa entre anticorpos, e são responsáveis por ligar o antígeno alvo. Cada cadeia é composta de domínios de imunoglobulina (Ig) individuais, e assim o termo genérico imunoglobulina é usado para tais proteínas.

Unidades estruturais de anticorpos tradicionais geralmente compreendem um tetrâmero. Cada tetrâmero é tipicamente composto de dois pares idênticos de cadeias de polipeptídeos, cada par tendo uma cadeia “leve” (geralmente tendo um peso molecular de cerca de 25 kDa) e uma cadeia “pesada” (geralmente tendo um peso molecular de cerca de 50 a 70 kDa). As cadeias leves humanas são

classificadas como cadeias leve kappa e lambda. As cadeias pesadas são classificadas como mu, delta, gama, alfa ou ípsilon e definem o isótipo do anticorpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tem diversas subclasses, inclusive, entre outras, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM tem subclasses, inclusive, entre outras, IgM1 e IgM2. IgA tem diversas subclasses, inclusive, entre outras, IgA1 e IgA2. Desta forma, "isótipo" conforme empregado aqui significa quaisquer das classes e subclasses de imunoglobulinas definidas pelas características químicas e antigênicas de suas regiões constantes. Os isótipos de imunoglobulina humana conhecidos são IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE.

10 Cada uma das cadeias leve e pesada são compostas de suas regiões distintas, denominadas regiões variável e constante. A cadeia pesada de IgG é composta de quatro domínios de imunoglobulina ligados a partir do terminal-N ao terminal-C na ordem VH-CH1-CH2-CH3, com referência ao domínio variável de cadeia pesada, domínio constante de cadeia pesada 1, domínio constante de cadeia pesada 2 e domínio constante de cadeia pesada 3, respectivamente (também denominado VH-C γ 1-C γ 2-C γ 3, com referência ao domínio variável de cadeia pesada, domínio de gama 1 constante, domínio de gama 2 constante e domínio de gama 3 constante, respectivamente). A cadeia leve de IgG é composta de dois domínios de imunoglobulina ligados a partir do terminal-N ao terminal-C na ordem VL-CL, com referência ao domínio variável de cadeia leve e ao domínio constante de cadeia leve, respectivamente. As regiões constantes mostram menos diversidade de sequência, e são responsáveis por ligar uma série de proteínas naturais para gerar eventos bioquímicos importantes. As características de distinção entre estas classes de anticorpos são suas regiões constantes, embora diferenças mais sutis possam existir na região variável.

A região variável de um anticorpo contém o antígeno que liga determinants da molécula, e assim determina a especificidade de um anticorpo para seu antígeno alvo. A região variável é denominada assim por ser a mais distinta em sequência de outros anticorpos dentro da mesma classe. A porção de terminal amino de cada cadeia inclui uma região variável de cerca de 100 a 110 ou mais aminoácidos principalmente responsáveis pelo reconhecimento de antígenos. Na região variável, três laços são agrupados para cada domínio V da cadeia pesada e cadeia leve para formar um local de ligação de antígenos. Cada um dos laços é denominado região de determinação de complementaridade (doravante denominada "CDR"), em que a variação na sequência de aminoácidos é mais significativa. Há 6 CDRs totais, cada três por cadeia leve e pesada, designados VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL

CDR1, VL CDR2 e VL CDR3. A região variável fora das CDRs é denominada região de estrutura (FR). Embora não diversa como as CDRs, a variabilidade de sequência ocorre na região de FR entre anticorpos diferentes. No geral, esta arquitetura característica de anticorpos fornece uma estrutura estável (a região de FR) mediante a qual a diversidade de ligação de antígenos substancial (as CDRs) pode ser explorada pelo sistema imune para obter especificidade para um amplo conjunto de antígenos. Uma série de estruturas de alta resolução são disponíveis para uma variedade de fragmentos de região a partir de organismos diferentes, alguns não ligados e alguns em complexo com antígeno. As características de sequência e estrutura das regiões variáveis de anticorpos são divulgadas, por exemplo, em Morea *et al.*, 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea *et al.*, 2000, *Métodos* 20:267-279, incorporadas aqui integralmente por referência, e as características conservadas de anticorpos são divulgadas, por exemplo, em Maynard *et al.*, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376, incorporadas aqui integralmente por referência.

A porção de terminal-carboxi de cada cadeia define uma região constante principalmente responsável pela função efetora. Na subclasse IgG de imunoglobulinas, há diversos domínios de imunoglobulina na cadeia pesada. “Domínio de imunoglobulina (Ig)” significa uma região de uma imunoglobulina tendo uma estrutura terciária distinta. São de interesse em modalidades descritas aqui os domínios de cadeia pesada, inclusive, os domínios de cadeia constante (CH) e a região de dobradiça. No contexto de anticorpos IgG, os isótipos IgG, cada um, têm três regiões CH. Consequentemente, os domínios “CH” no contexto de IgG são como segue: “CH1” se refere às posições 118 a 220 de acordo com o índice EU como em Kabat. “CH2” se refere às posições 237 a 340 de acordo com o índice EU como em Kabat, e “CH3” se refere às posições 341 a 447 de acordo com o índice EU como em Kabat.

Outra região importante da cadeia pesada é a região de dobradiça. “Dobradiça” ou “região de dobradiça” ou “região de dobradiça do anticorpo” ou “região de dobradiça de imunoglobulina” aqui significa o polipeptídeo flexível que compreende os aminoácidos entre o primeiro e o segundo domínios constantes de um anticorpo. Estruturalmente, o domínio IgG CH1 termina na posição EU 220, e o domínio IgG CH2 começa na posição EU residual 237. Desta forma, para IgG a dobradiça do anticorpo é aqui definida de modo a incluir as posições 221 (D221 em IgG1) a 236 (G236 em IgG1), em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Em algumas modalidades, por exemplo, no contexto de uma região de Fc, é incluída a dobradiça inferior, com a “dobradiça inferior” geralmente se

referindo às posições 226 ou 230 até 236.

São descritas aqui de interesse em modalidades as regiões de Fc. "Fc" ou "região de Fc" conforme empregado aqui significa o polipeptídeo que compreende a região constante de um anticorpo, com exceção do primeiro domínio de imunoglobulina de região constante e, em alguns casos, a parte da dobradiça. Assim, Fc se refere aos dois últimos domínios de imunoglobulina de região constante de IgA, IgD e IgG, e os três últimos domínios de imunoglobulina de região constante de IgE e IgM, e o terminal-N de dobradiça a estes domínios. Para IgA e IgM, Fc pode incluir a cadeia J. Para IgG, Fc compreende os domínios de imunoglobulina Cgamma2 e Cgamma3 (C γ 2 e C γ 3) e a região de dobradiça inferior entre Cgamma1 (C γ 1) e Cgamma2 (C γ 2). Embora os limites da região de Fc possam variar, a região de Fc de cadeia pesada de IgG humana é geralmente definida para incluir os resíduos C226 ou P230 em seu terminal-carboxil, em que a numeração é de acordo com o índice EU como em Kabat. Fc pode se referir a esta região isolada, ou esta região no contexto de um polipeptídeo de Fc, conforme descrito abaixo, "Polipeptídeo de Fc" conforme empregado aqui significa um polipeptídeo que compreende toda ou parte de uma região de Fc. Os polipeptídeos de Fc incluem anticorpos, fusões de Fc, Fcs isolados e fragmentos de Fc.

A região de Fc de um anticorpo interage com uma série de receptores e ligantes de Fc, fornecendo um conjunto de capacidades funcionais importantes denominadas funções efetoras. Para IgG da região de Fc, Fc compreende os domínios de Ig C γ 2 e C γ 3 e a dobradiça de terminal-N levando a C γ 2. Uma família importante de receptores de Fc para a classe IgG são os receptores gama Fc (Fc γ Rs). Estes receptores mediam a comunicação entre anticorpos e o braço celular do sistema imune (Raghavan *et al.*, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ravetch *et al.*, 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290, ambos incorporados integralmente aqui por referência). Em humanos, esta família de proteínas inclui Fc γ RI (CD64), inclusive isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb e Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), incluindo isoformas Fc γ RIIa (incluindo alótipos H131 e R131), Fc γ RIIb (inclusive Fc γ RIIb-1 e Fc γ RIIb-2) e Fc γ RIIc; e Fc γ RIII (CD16), inclusive Fc γ RIIIa (inclusive alótipos V158 e F158) e Fc γ RIIIb (inclusive alótipos Fc γ RIIIb-NA1 e Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65, incorporados integralmente aqui por referência). Estes receptores geralmente têm um domínio extracelular que media a ligação a Fc, uma região que abrange membranas, e um domínio intracelular que pode mediar algum evento sinalizador dentro da célula. Estes receptores são expressos em uma variedade de células imunes incluindo monócitos, macrófagos, neutrófilos, células

dendríticas, eosinófilos, mastócitos, plaquetas, células B, linfócitos grandes granulares, células de Langerhans, células *natural killers* (NK), e células $\gamma\gamma$ T. A formação do complexo Fc/Fc γ R recruta estas células efetoras de antígeno ligado, geralmente resultando em eventos sinalizadores dentro das células e respostas imunes subsequentes importantes, como a liberação de mediadores de inflamação, ativação de células B, endocitose, fagocitose e ataque citotóxico. A capacidade de mediar funções efetoras citotóxicas e fagocitose é um mecanismo potencial através do qual os anticorpos destroem células alvejadas. A reação mediada por células em que células citotóxicas não-específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e subsequentemente causam lise da célula alvo é denominada citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (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, ambos incorporados aqui integralmente por referência). A reação mediada por células em que células em que células citotóxicas não-específicas que expressam Fc γ Rs reconhecem o anticorpo ligado em uma célula alvo e, subsequentemente, causam fagocitose da célula alvo é denominada aqui fagocitose mediada por células dependentes de anticorpos (ADCP).

As subclasses de IgG diferentes tem afinidades diferentes para Fc γ Rs, com IgG1 e IgG3 geralmente se ligando substancialmente melhor aos receptores IgG2 e IgG4 (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82:57-65, incorporados aqui integralmente por referência). Fc γ Rs se liga à região de Fc de IgG com afinidades diferentes. Os domínios extracelulares de Fc γ RIIIa e Fc γ RIIIb são 96% idênticos, no entanto, Fc γ RIIIb não tem um domínio sinalizador intracelular. Além disso, enquanto Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, e Fc γ RIIIa são reguladores positivos de ativação acionada por complexo imune, caracterizados por ter um domínio intracelular que tem um motivo de ativação baseado em tirosina imunoreceptora (ITAM), Fc γ RIIIb tem um motivo de inibição baseado em tirosina imunoreceptora (ITIM) e, portanto, é inibidor. Desta forma, os primeiros são denominados receptores de ativação, e Fc γ RIIIb é denominado receptor inibidor. Apesar destas diferenças em afinidades e atividades, todos os Fc γ Rs se ligam a mesma região em Fc, no terminal-N do domínio de C γ 2 e da dobradiça anterior. Esta interação é bem caracterizada de forma estrutural (Sondermann *et al.*, 2001, *J Mol Biol* 309:737-749, incorporada integralmente aqui por referência), e diversas estruturas de Fc humano ligado ao domínio extracelular de Fc γ RIIIb humano têm sido resolvidas (código de acesso pdb 1E4K) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406:267-273, incorporado integralmente aqui por referência)

(códigos de acesso pdb 1IIS e 1IIX) (Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:16469-16477, incorporado integralmente aqui por referência).

Um local de sobreposição mas separado em Fc é usado como a interface para a proteína de complemento C1q. Da mesma forma que a ligação de Fc/Fc γ R media ADCC, a ligação de Fc/C1q media citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Um local em Fc entre os domínios C γ 2 e C γ 3 media a interação com o receptor neonatal FcRn, a ligação que recicla o anticorpo submetido a endocitose a partir do endossomo de volta à corrente sanguínea (Raghavan *et al.*, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie *et al.*, 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766, ambos incorporados integralmente aqui por referência). Este processo, juntamente com a preclusão de filtração de rins devido ao tamanho grande da molécula de comprimento, resulta em meias vidas séricas de anticorpo favoráveis variando de uma a três semanas. A ligação de Fc a FcRn também desempenha um papel importante no transporte de anticorpos. O local de ligação para FcRn em Fc também é o local em que as proteínas bacterianas A e G são ligadas. A ligação estreita por estas proteínas é geralmente explorada como um meio de purificar anticorpos empregando a cromatografia de afinidade por proteína A ou proteína G durante a purificação de proteínas. A fidelidade destas regiões e as regiões de ligação de complemento e FcRn/proteína A são importantes para ambas as propriedades clínicas dos anticorpos e seu desenvolvimento.

Uma característica chave da região de Fv é a glicosilação ligada a N conservada que ocorre em N297. Este carboidrato, ou oligossacarídeo, conforme denominado algumas vezes, desempenha um papel estrutural e funcional importante para o anticorpo, e é uma das razões principais para que estes anticorpos sejam produzidos usando sistemas de expressão de mamíferos. A ligação de Fc eficiente a Fc γ R e C1q requer esta modificação, e alterações na composição do carboidrato N297 ou sua eliminação afetam a ligação a estas proteínas (Umana *et al.*, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:45539-45547.; Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons *et al.*, 2002, J Immunol Methods 263:133-147, todos incorporados aqui integralmente por referência).

As imunoglobulinas de modalidades descritas aqui podem também ser uma proteína semelhante a anticorpo como uma fusão de Fc (Chamow *et al.*, 1996,

Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200, ambos incorporados aqui integralmente por referência). “Fusão de Fc” aqui deve ser sinônimo dos termos “imunoadesão”, “fusão de Ig”, “quimera de Ig” e “globulina receptora” (às vezes com traços) conforme empregado no estado da técnica (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200). Uma fusão de Fc é uma proteína em que um ou mais polipeptídeos, denominados “parceiro de fusão”, são ligados de forma operacional a Fc. Uma fusão de Fc combina a região de Fc de um anticorpo, e assim suas funções efectoras favoráveis e farmacocinéticas, com a região de ligação alvo de um receptor, ligante ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. O papel do último é mediar o reconhecimento alvo, e assim é funcionalmente análogo à região variável do anticorpo. Devido à sobreposição estrutural e funcional de fusões de Fc com anticorpos, a discussão sobre anticorpos na presente divulgação se estende também a fusões de Fc.

Praticamente qualquer proteína ou molécula pequena pode ser ligada a Fc para gerar uma fusão de Fc. Os parceiros de fusão de proteína podem incluir, entre outros, a região variável de qualquer anticorpo, a região de ligação alvo de um receptor, uma molécula de adesão, um ligante, uma enzima, uma citosina, uma quemoquina ou alguma outra proteína ou domínio de proteína. Os parceiros de fusão de moléculas pequenas podem incluir qualquer agente que direcione a fusão de Fc a um antígeno alvo. Tal antígeno alvo pode ser qualquer molécula, e.g., um receptor extracelular, que é implicado em doença. As fusões de Fc de modalidades descritas aqui, de preferência, tem especificidade para IgE. Por exemplo, em modalidades preferenciais, as fusões de Fc da invenção podem compreender Fc ϵ RI ou Fc ϵ RII/CD23 como um parceiro de fusão. As fusões de Fc da invenção, de preferência, compreendem uma ou mais variantes na região de Fc para aumentar a afinidade para Fc γ RIIb.

Os parceiros de fusão podem ser ligados a qualquer região de uma região de Fc, inclusive nos terminais-N ou -C, ou em alguns resíduos entre os terminais. Em uma modalidade, um parceiro de fusão é ligado no terminal-N ou -C da região de Fc. Uma variedade de ligantes pode ser usada em algumas modalidades descritas aqui para ligar de forma covalente regiões de Fc a um parceiro de fusão. “Ligante”, “sequência de ligante”, “espaçador”, “sequência de corrente” ou seus equivalentes gramaticais, aqui significa uma molécula ou grupo de moléculas (como um monômero ou polímero) que conectam duas moléculas e com frequência servem para colocar duas moléculas em uma configuração. Os ligantes são conhecidos na

técnica; por exemplo, ligantes bifuncionais homo ou hetero são bem conhecidos (veja, catálogo 1994 Pierce Chemical Company, seção técnica sobre ligantes cruzados, páginas 155 a 200, incorporado aqui integralmente por referência). Uma série de estratégias pode ser usada para ligar moléculas de forma covalente. Estas incluem, entre outras, ligações de polipeptídeos entre terminais-N ou -C de proteínas ou domínios de proteína, ligação através de ligações de dissulfeto e ligação através de reagentes de ligação cruzada química. Em um aspecto desta modalidade, o ligante é uma ligação de peptídeos, gerada por técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos. O peptídeo ligante pode, predominantemente, incluir os seguintes resíduos de aminoácidos: Gli, Ser, Ala, ou Tre. O peptídeo ligante deve ter um comprimento adequado para ligar duas moléculas de modo que elas assumam a conformação correta uma em relação a outra de modo que retenham a atividade desejada. Comprimentos adequados para este propósito incluem no mínimo um e no máximo 50 resíduos de aminoácidos. Em uma modalidade, o ligante tem cerca de 1 a 30 aminoácidos de comprimento. Em uma modalidade, os ligantes de 1 a 20 aminoácidos de comprimento podem ser usados. Ligantes úteis incluem polímeros de glicina-serina (inclusive, por exemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n (estabelecido como ID DE SEQ N°: 1), (GGGGS)_n (estabelecido como ID DE SEQ N°: 2), e (GGGS)_n (estabelecido como ID DE SEQ N°:3), onde n é um número inteiro de pelo menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, e outros ligantes flexíveis, conforme será apreciado por aqueles versados na técnica. Como alternativa, uma variedade de polímeros não-proteináceos, inclusive, entre outros, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, podem ser usados como ligantes, ou seja, podem ser usados para ligar uma região de Fc a um parceiro de fusão.

Também são contemplados aqui como parceiros de fusão polipeptídeos de Fc. Assim, uma imunoglobulina, conforme descrito aqui pode ser um polipeptídeo de Fc multimérico, que compreende duas ou mais regiões de Fc. A vantagem de tal molécula é fornecer diversos locais de ligação para receptores de Fc com uma molécula de proteína única. Em uma modalidade, as regiões de Fc podem ser ligadas usando uma abordagem de engenharia química. Por exemplo, Fabs e Fcs podem ser ligados por ligações de tioéter que são originadas em resíduos de cisteína nas dobradiças, gerando moléculas como FabFc₂. As regiões de Fc podem ser ligadas usando engenharia de dissulfeto e/ou ligação cruzada química. Em uma modalidade, as regiões de Fc podem ser ligadas de forma genética. Em uma

modalidade, as regiões de Fc em uma imunoglobulina são ligadas de forma genética a regiões de Fc ligadas geradas *in tandem* conforme descrito em USSN 11/022,289, depositada em 12/21/2004, denominada "Polipeptídeos de Fc com novos locais de ligação de ligantes de Fc", incorporada aqui integralmente por referência. Polipeptídeos de Fc ligados *in tandem* podem compreender duas ou mais regiões de Fc, e.g., uma a três regiões de Fc, duas regiões de Fc. Pode ser vantajoso explorar uma série de construtos de engenharia para obter regiões de Fc ligadas *in tandem* homo ou hétero com as propriedades estruturais e funcionais mais favoráveis. Regiões de Fc ligadas *in tandem* podem ser regiões de Fc ligadas *in tandem* homo, ou seja, uma região de Fc de um isótipo é geneticamente fundida a outra região de Fc do mesmo isótipo. É previsto que uma vez que há diversos Fc γ R, C1q, e/ou locais de ligação de FcRn em polipeptídeos de Fc ligados *in tandem*, as funções efectoras e/ou farmacocinéticos podem ser aprimorados. Em uma modalidade alternativa, as regiões de Fc de isótipos diferentes podem ser ligadas *in tandem* denominadas regiões de Fc ligadas *in tandem* aos isótipos. Por exemplo, devido à capacidade de alvejar receptores de Fc γ R e Fc α RI, uma imunoglobulina que liga ambos Fc γ Rs e Fc α RI pode fornecer uma melhora clínica significativa.

As imunoglobulinas das modalidades divulgadas aqui podem ser substancialmente codificadas por genes de imunoglobulina a qualquer uma das classes de anticorpos. Em certas modalidades, as imunoglobulinas divulgadas aqui são usadas em anticorpos ou fusões de Fc que compreendem sequências que pertencem à classe IgG de anticorpos, inclusive IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. A Figura 1 fornece um alinhamento destas sequências de IgG humana. Em modalidades alternativas, as imunoglobulinas divulgadas aqui são usadas em anticorpos ou fusões de Fc que compreendem sequências que pertencem à IgA (inclusive as subclasses IgA1e IgA2), classes IgD, IgE, IgG, ou IgM de anticorpos. As imunoglobulinas divulgadas aqui podem compreender mais de uma cadeia de proteínas, e.g., podem ser um anticorpo ou fusão de Fc que é um monômero ou um oligômero, inclusive um oligômero homo ou hetero.

As imunoglobulinas divulgadas aqui podem ser substancialmente codificadas por genes de qualquer organismo, e.g. mamíferos (inclusive, entre outros, humanos, roedores (inclusive, entre outros, camundongos e ratos), lagomorfos (inclusive, entre outros, coelhos e lebres), camelídeos (inclusive, entre outros, camelos, lhamas e dromedários), e primatas não-humanos, inclusive, entre outros, Prosimianos, Platirrininos (macacos do Novo Mundo), Cercopitecoides (macacos do Mundo Antigo), e Homínoides, inclusive os *Gibbons*, *Lesser* e Grandes Primatas. Em certas

modalidades, as imunoglobulinas divulgadas aqui podem ser substancialmente humanas.

Como é bem conhecido na técnica, os polimorfismos de imunoglobulina existem na população humana. O polimorfismo de Gm é determinado pelos genes IGHG1, IGHG2 e IGHG3 que têm alelos que codificam determinantes antigênicos 5 alotípicos denominados alótipos G1m, G2m e G3m para marcadores das moléculas IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (nenhum alótipo Gm foi encontrado na cadeia gama 4). Os marcadores podem ser classificados em “alótipos” e “isoalótipos”. Estes são distintos em bases sorológicas diferentes que dependem de homologias de 10 sequência fortes entre isótipos. Os alótipos são determinantes antigênicos especificados por formas alélicas dos genes Ig. Os alótipos representam pequenas diferenças nas sequências de aminoácidos de cadeias pesada ou leve de indivíduos diferentes. Mesmo uma única diferença de aminoácidos pode causar um determinante alotípico, embora em muitos casos tenham ocorrido diversas 15 substituições de aminoácidos. Os alótipos são diferenças de sequência entre alelos de uma subclasse através da qual os anti-soros reconhecem somente as diferenças alélicas. Um isoalótipo é um alelo em um isótipo que produz um epítipo que é compartilhado com uma região homóloga não-polifórmica de um ou mais outros isótipos e devido a isto os anti-soros reagirão com ambos os alótipos relevantes e 20 os isótipos homólogos relevantes (Clark, 1997, mecanismos efetores de IgG, Chem Immunol. 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, Semin Immunol 2(6):457-66, ambos incorporados aqui integralmente por referência).

As formas alélicas de imunoglobulinas humanas foram bem caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human 25 immunoglobulins. J Immunogen 1976, 3: 357-362; WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, Eur. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51, todos incorporados aqui integralmente por referência). Além disso, outros polimorfismos foram caracterizados (Kim *et al.*, 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9, incorporado aqui 30 integralmente por referência). Atualmente, 18 alótipos de Gm são conhecidos: G1m (1, 2, 3, 17) ou G1m (a, x, f, z), G2m (23) ou G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) ou G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5) (Lefranc, *et al.*, The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. *et al.*, 1979, Hum. 35 Genet.: 50, 199-211, ambos incorporados integralmente aqui por referência). Os alótipos que são herdados em combinações fixadas são chamados haplótipos de

Gm. As imunoglobulinas divulgadas aqui podem ser substancialmente codificadas por qualquer alótipo, isoalótipo ou haplótipo de qualquer gene de imunoglobulina.

As imunoglobulinas divulgadas aqui podem compor um polipeptídeo de Fc, inclusive, entre outros, anticorpos, Fcs isolados, fragmentos de Fc e fusões de Fc.

5 Em uma modalidade, uma imunoglobulina divulgada aqui é um anticorpo de comprimento total, constituindo a forma biológica natural de um anticorpo, inclusive regiões variáveis e constantes. Para o isótipo de IgG o anticorpo de comprimento total é um tetrâmero e consiste de dois pares idênticos de duas cadeias de imunoglobulina, cada par tendo uma cadeia leve e uma cadeia pesada, cada cadeia

10 leve compreendendo domínios de imunoglobulina VL e CL, e cada cadeia pesada compreendendo domínios de imunoglobulina VH, C γ 1, C γ 2, e C γ 3. Em outra modalidade, as imunoglobulinas divulgadas aqui são regiões de Fc isoladas ou fragmentos de Fc.

As imunoglobulinas divulgadas aqui podem ser uma variedade de estruturas, inclusive, entre outras, fragmentos de anticorpos, anticorpos biespecíficos, minicorpos, anticorpos de domínio, anticorpos sintéticos (algumas vezes denominados "anticorpos miméticos"), anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados, fusões de anticorpos (algumas vezes denominadas "conjugados de anticorpos"), e fragmentos de cada um, respectivamente.

Em uma modalidade, o anticorpo é um fragmento de anticorpo. Fragmentos de anticorpos específicos incluem, entre outros, (i) o fragmento de Fab que consiste dos domínios de VL, VH, CL e CH1 (ii) o fragmento de Fd que consiste dos domínios de VH e CH1, (iii) o fragmento de Fv que consiste dos domínios de VL e VH de um único anticorpo; (iv) o fragmento de dAb, que consiste de uma única

25 variável, (v) regiões de CDR isoladas, (vi) fragmentos de F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmentos de Fab ligados (vii) moléculas de Fv de cadeia única (scFv), em que um domínio de VH e um domínio de VL são ligados por um ligante de peptídeos que permite que os dois domínios sejam associados para formar um local de ligação de antígenos, (viii) dímeros de Fv de cadeia única, e (ix)

30 "diacorpos" ou "triacorpos", fragmentos multivalentes ou multiespecíficos construídos por fusão de genes. Os fragmentos de anticorpo podem ser modificados. Por exemplo, as moléculas podem ser estabilizadas pela incorporação de pontes de dissulfeto que ligam os domínios VH e VL. Exemplos de formatos e arquiteturas de anticorpos são descritos em Holliger & Hudson, 2006, Nature

35 Biotechnology 23(9):1126-1136, e Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6:343-

357 e referência citadas nestes, todas expressamente incorporados aqui por referência.

Em uma modalidade, um anticorpo divulgado aqui pode ser um anticorpo multiespecífico, e notavelmente um anticorpo biespecífico, ainda algumas vezes denominados “diacorpos”. Estes são anticorpos que se ligam a dois (ou mais) antígenos diferentes. Diacorpos podem ser fabricados em uma variedade de formas conhecidas na técnica, e.g., preparados de forma química ou a partir de hibridomas híbridos. Em uma modalidade, o anticorpo é um minicorpo. Os minicorpos são proteínas semelhantes a anticorpos minimizadas que compreende um scFv ligado a um domínio CH3. Em alguns casos, o scFv pode ser ligado à região de Fc, e pode incluir alguma ou toda a região de dobradiça. Para uma descrição de anticorpos multiespecíficos veja Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23(9):1126-1136 e referências citadas neste, todas expressamente incorporadas aqui por referência.

Anticorpos Não-humanos, Quiméricos, Humanizados e Complementamente Humanos

A região variável de um anticorpo, como é bem conhecido na técnica, pode compor sequências a partir de uma variedade de espécies. Em algumas modalidades, a região variável de anticorpo pode ser de uma fonte não-humana, inclusive, entre outras, camundongos, ratos, coelhos, camelos, lhamas e macacos. Em algumas modalidades, os componentes estruturados podem ser uma mistura de diferentes espécies. Como tal, um anticorpo divulgado aqui pode ser um anticorpo quimérico e/ou um anticorpo humanizado. No geral, ambos os “anticorpos quiméricos” e “anticorpos humanizados” se referem a anticorpos que combinam regiões de mais de uma espécie. Por exemplo, “anticorpos quiméricos”, tradicionalmente compreendem regiões variáveis de um camundongo ou outras espécies não-humanas e as regiões constantes de um humano.

“Anticorpos humanizados” geralmente se referem a anticorpos não-humanos que tenham tido as regiões de estrutura de domínio variável trocadas por sequências encontradas em anticorpos humanos. Geralmente, em um anticorpo humanizado, o anticorpo todo, exceto os CDRs, é codificado por um polinucleotídeo de origem humana ou é idêntico a tal anticorpo exceto dentro de seus CDRs. Os CDRs, alguns ou todos codificados por ácidos nucleicos que se originam em um organismo não-humano, são enxertados em uma estrutura de folha beta de uma região variável de anticorpo humano para criar um anticorpo, cuja especificidade é

determinada pelos CDRs enxertados. A criação de tais anticorpos é descrita em, e.g., WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536. A "mutação reversa" de resíduos de estrutura de aceitação aos resíduos do doador correspondente geralmente é exigida para recuperar a afinidade que é perdida no construto inicial enxertado (Patente Nº U.S. 5.693.762, incorporada integralmente aqui por referência. O anticorpo humanizado de forma ideal também compreenderá pelo menos uma porção de uma região de imunoglobulina constante, geralmente aquela de uma imunoglobulina humana, e assim compreenderá geralmente uma região de Fc humana. Os anticorpos humanizados podem ser gerados usando camundongos com sistema imune engenheirado de forma genética. Roque *et al.*, 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Uma variedade de técnicas e métodos para humanizar e remoldar anticorpos não-humanos são bem conhecidos na técnica (Veja Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), e referências citadas nestes). A humanização ou outros métodos para reduzir a imunogenicidade de regiões variáveis de anticorpos não-humanos podem incluir métodos de recomposição da superfície, como descrito, por exemplo, em Roguska *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973. Em uma modalidade, o anticorpo foi submetido à maturação de afinidade, conforme é conhecido na técnica. Métodos baseados em estrutura podem ser empregados para maturação de humanização e afinidade, por exemplo, conforme descrito na Patente Nº de Série U.S. 11/004.590. Métodos baseados em seleção podem ser utilizados para humanizar e/ou maturar por afinidade as regiões variáveis de anticorpos, isso é, aumentar a afinidade da região variável para o seu antígeno alvo. Outros métodos de humanização podem envolver o enxerto apenas de partes de CDRs, incluindo, mas não sendo limitado aos métodos descritos em USSN 09/810,502; Tan *et al.*, 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis *et al.*, 2002, J. Immunol. 169:3076-3084. Métodos baseados em estrutura podem ser utilizados para a humanização e maturação por afinidade, por exemplo, como descrito em USSN 10/153,159 e em depósitos relacionados, todos incorporados em sua totalidade por referência. Em certas variedades, a imunogenicidade do anticorpo é reduzida com o uso de método descrito em Lazar *et al.*, 2007, Mol Immunol 44:1986-1998 and USSN 11/004,590, intitulado "*Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof*", depositado em 3 de dezembro de 2004, incorporado em sua totalidade por referência.

Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo completamente humano

com pelo menos uma modificação como descrita neste. “Anticorpo completamente humano” ou “anticorpo humano completo” se refere a um anticorpo humano contendo a sequência genética de um anticorpo fornecido de um cromossoma humano com as modificações descritas neste. Anticorpos completamente humanos
5 podem ser obtidos, por exemplo, com o uso de camundongos transgênicos (Bruggemann *et al.*, 1997, *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458) ou bibliotecas de anticorpos humanos acoplados com métodos de seleção (Griffiths *et al.*, 1998, *Curr Opin Biotechnol* 9:102-108). Em uma modalidade, anticorpos equivalentes aos humanos podem ser gerados por forma computacional como definido
10 PCT/US09/41144, que é incorporado neste por referência.

Anticorpos Anti-IgE

As imunoglobulinas descritas neste se ligam a IgE. Os anticorpos anti-IgE da invenção podem compreender qualquer região variável, conhecida ou ainda não conhecida, que tem especificidade para IgE. Anticorpos anti-IgE conhecidos
15 incluem, mas não são limitados a, anticorpos murina MaE11, MaE13, e MaE15, versões desses anticorpos humanizadas e/ou criadas por engenharia genética, incluindo E25, E26, e E27, particularmente E25, também conhecido como rhuMab-E25, também conhecido como Omalizumab, como os descritos em US6761889, US6329509, US20080003218A1, e Presta, LG *et al.*, 1993, *J Immunol* 151:2623–
20 2632, todos expressamente incorporados neste por referência. Uma versão criada por engenharia genética preferencial de MaE11 é H1L1 MaE11, descrito nos Exemplos deste. Outro anti-IgE que pode ser útil para a invenção inclui o anticorpo murina TES-C21, TES-C21 quimérico, também conhecido como CGP51901 (Corne, J *et al.*, 1997, *J Clin Invest* 99:879–887; Racine-Poon, A *et al.*, 1997, *Clin Pharmacol Ther* 62:675–690),
25 versões desses anticorpos humanizadas e/ou criadas por engenharia genética, incluindo, mas não limitado a, CGP56901, também conhecido como TNX-901, como os anticorpos descritos em Kolbinger, F *et al.*, 1993, *Protein Eng* 6:971–980. Outros anticorpos anti-IgE que podem ser úteis para a invenção são descritos em US6066718, US6072035, PCT/US04/02894, US5342924, US5091313,
30 US5449760, US5543144, US5342924, e US5614611, todos os quais são incorporados neste por referência. Outros anticorpos anti-IgE úteis incluem o anticorpo murina BSW17. Sequências de aminoácidos da região variável dos domínios VH e VL e CDRs de alguns desses anticorpos são fornecidos na Figura 5;

Propriedades de Ligação de Variantes de Fc e Receptor Fc

35 As imunoglobulinas divulgadas neste podem compreender uma variante Fc. Uma variante Fc compreende uma ou mais modificações de sequências de

aminoácido relativas a um polipeptídio Fc principal, em que as modificações de aminoácidos fornecem uma ou mais propriedades otimizadas. Uma variante Fc divulgado neste difere em sequência de aminoácidos de sua principal por virtude de pelo menos uma modificação de aminoácido. Assim, variantes de Fc divulgados neste possuem pelo menos uma modificação de aminoácido quando comparado com a principal. Como alternativa, as variantes de Fc divulgados neste podem ter mais de uma modificação de aminoácido quando comparado com a principal, por exemplo, de cerca de uma a cinquenta modificações de aminoácido, por exemplo, de cerca de uma a dez modificações de aminoácido, de cerca de uma a cinco modificações de aminoácido etc. quando comparado com a principal. Assim, as sequências de variações de aminoácido e as dos polipeptídios Fc principal e dos polipeptídios Fc principal são substancialmente homólogos. Por exemplo, a variante das sequências Fc variantes neste possuirão cerca de 80% de homologia com a sequência de variantes Fc principal, por exemplo, cerca de 90% de homologia, , cerca de 95% de homologia, cerca de 98% de homologia, cerca de 99% de homologia etc. As modificações divulgadas neste incluem modificações de aminoácidos, incluindo inserções, deleções e substituições. As modificações divulgadas neste também incluem modificações de glicofoma. As modificações podem ser feitas geneticamente com o uso de biologia molecular, ou feitas enzimaticamente ou quimicamente.

Variantes de Fc divulgados neste são definidos de acordo com as modificações de aminoácido que as compõem. Assim, por exemplo, S267E é uma variante Fc com a substituição S267E relativa ao polipeptídio Fc principal. Da mesma forma, S267E/L328F define uma variante Fc com as substituições S267E e L328F relativas ao polipeptídio Fc principal. A identidade do aminoácido WT pode ser não especificada, caso no qual a variante já mencionada como 267E/328F. É observado que, de forma que as substituições sejam fornecidas de forma arbitrária, o que quer dizer que, por exemplo, 267E/328F é igual à variante de Fc como 328F/267E, e assim por diante. A não ser que especificado de outra forma, as posições discutidas neste são numeradas de acordo com o índice EU ou o esquema de numeração EU (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, incorporados neste em sua totalidade por referência). O índice EU ou índice de EU como Kabat ou esquema de numeração EU se refere a numeração do anticorpo EU (Edelman *et al.*, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85, incorporados neste em sua totalidade por referência).

Em certas modalidades, as variantes de Fc divulgados neste tem base em sequências IgG humanas, e, assim, as sequências de IgG humanas são utilizadas como sequências “base” contra as quais outras sequências são comparadas, incluindo, mas não limitado às sequências de outros organismos, como sequências de roedores e primatas. As imunoglobulinas também podem compreender sequências de outras classes de imunoglobulinas como IgA, IgE, IgGD, IgGM e similares. É observado que, apesar das variantes de Fc divulgadas neste serem criadas no contexto de um IgG principal, as variantes podem ser criadas ou “transferidas” do contexto de outro segundo IgG principal. Isso é feito através da determinação dos resíduos e substituições “equivalentes” ou “correspondentes” entre um primeiro e um segundo IgG, tipicamente baseado na homologia de sequência ou estrutural entre o primeiro e o segundo IgG. Para determinar a homologia, a sequência de aminoácidos de um primeiro IgG descrito neste é diretamente comparada com a sequência de um segundo IgG. A pós a linhagem das sequências, o uso de um ou mais programas de alinhamento de homologia conhecidos na técnica (por exemplo, usando resíduos conservados como entre espécies), a permissão de inserções e deleções necessárias de forma a manter o alinhamento (isso é, evitando a eliminação de resíduos conservados através da deleção e inserção arbitrária), os resíduos equivalentes a aminoácidos específicos na sequência primária da primeira imunoglobulina são definidos. No entanto, o alinhamento de mais de 75% ou de menos de 50% de resíduos conservados é também adequado para definir os resíduos equivalentes. Os resíduos equivalentes também podem ser definidos pela determinação da homologia estrutural entre um primeiro e um segundo IgG que esteja no nível de uma estrutura terciária para IgGs cujas estruturas já tenham sido determinadas. Nesse caso, os resíduos equivalentes são definidos como aqueles para os quais as coordenadas atômicas de dois ou mais da cadeia principal de átomos de um resíduo específico de aminoácidos da principal ou precursor (N em N, CA em CA, C em C e O em O) estejam entre 0,13 nm, após o alinhamento. Em outra modalidade, os resíduos equivalentes estão entre cerca de 0,1 nm após o alinhamento. O alinhamento é alcançado após o melhor modelo ter sido orientado e posicionado para fornecer a maior sobreposição de coordenadas atômicas de átomos de proteínas de não hidrogênio das proteínas. Independentemente de como os resíduos equivalentes ou correspondentes sejam determinados, e independentemente da identidade do IgG principal no qual os IgGs tenham sido feitos, o que deve ser observado é que os variantes de Fc descobertos como divulgado neste podem ser formulados em qualquer segundo IgG principal

que tenham uma sequência significativa ou homologia estrutural com o variante de Fc. Assim, por exemplo, se um anticorpo variante for gerado em que o anticorpo principal é IgG1 humano, através do uso dos métodos descritos acima ou outros métodos para determinar resíduos equivalentes, o anticorpo variante e pode ser projetado em outro anticorpo IgG principal que se liga a um antígeno diferente, um anticorpo principal IgG2 humano, um anticorpo principal IgA humano, um anticorpo principal de camundongo IgG2a ou IgG2b e similares. Novamente, como descrito acima, o contexto da variante de Fc principal não afeta a capacidade de transferir as variantes de Fc divulgadas neste para outros IgG principal.

As variantes de Fc divulgadas aqui podem ser otimizadas para uma variedade de propriedades de ligação do receptor de Fc. Uma variante de Fc que é projetada ou prevista para exibir uma ou mais das propriedades otimizadas é aqui referido como uma "variante otimizada de Fc". Propriedades que podem ser otimizadas incluem, mas não estão limitados à afinidade aumentada ou reduzida para um Fc γ R. Em uma modalidade, as variantes de Fc divulgadas aqui são otimizadas para possuir afinidade maior com um inibidor do receptor Fc γ R11b. Em outras modalidades, as imunoglobulinas aqui divulgadas fornecem maior afinidade para Fc γ R11b, mas afinidade reduzida para um ou mais ativadores, incluindo, por exemplo, Fc γ R1, Fc γ R11a, Fc γ R111a, e/ou Fc γ R111b. Os receptores de Fc γ R podem ser expressos em células de qualquer organismo, inclusive, mas não limitado a humanos, macacos cinomolgos e ratos. As variantes de Fc divulgadas aqui podem ser otimizadas para possuir afinidade maior para o Fc γ R11b humano.

Por "maior afinidade", ou "afinidade melhor", ou "afinidade aprimorada" ou "mais afinidade" de um polipeptídeo Fc principal, como aqui utilizado, significa que um variante de Fc se liga a um receptor de Fc com uma constante de equilíbrio muito maior de associação (K_A ou K_a) ou menor equilíbrio constante de dissociação (K_D ou K_d) que o polipeptídeo de Fc principal quando as quantidade de polipeptídeo variante e principal no ensaio de ligação são essencialmente os mesmos. Por exemplo, o variante de Fc com melhor afinidade de ligação com receptor de Fc pode exibir a partir de cerca de 5 vezes a cerca de 1000 vezes, por exemplo, de cerca de 10 vezes a cerca de 500 vezes de melhoria na afinidade de ligação ao receptor de Fc em comparação com o polipeptídeo Fc principal, onde a afinidade de ligação com o receptor de Fc é determinada, por exemplo, pelos métodos de ligação divulgados aqui, inclusive, mas não limitado a, Biacore, por aquele habilitado na técnico. Por conseguinte, por "afinidade reduzida" em relação a um polipeptídeo de Fc principal como aqui utilizado, significa que uma variante de Fc se liga a um receptor de Fc

com K_A significativamente menor, ou K_D menor que o polipeptídeo de Fc principal. A maior ou menor afinidade também pode ser definida em relação a um nível absoluto de afinidade. Por exemplo, segundo os dados deste, WT (nativo) IgG1 se liga a $Fc\gamma RIIb$ com uma afinidade de cerca de 2 μM , ou cerca de 2000 nm. Além disso, algumas variantes de Fc aqui descritos se ligam a $Fc\gamma RIIb$ com uma afinidade de aproximadamente 10 vezes maior para WT IgG1. Conforme divulgado aqui, a afinidade maior ou melhor significa ter um K_D inferior a cerca de 100 nm, por exemplo, entre cerca de 10 nm - 100 nm, entre cerca de 1 - cerca de 100 nm, ou menos de cerca de 1 nm.

Os anticorpos anti-IgE da invenção preferencialmente possuem elevada afinidade para $Fc\gamma RIIb$. Por afinidade alta aqui se entende que a afinidade da interação entre o anticorpo e $Fc\gamma RIIb$ é mais forte do que 100 nm. Isso quer dizer que o equilíbrio da constante de equilíbrio K_d para a ligação do anticorpo ao $Fc\gamma RIIb$ seja inferior a 100 nM.

Em uma modalidade, as variantes de Fc seletivamente fornecem maior afinidade para $Fc\gamma RIIb$ com relação a um ou mais receptores de ativação. A atividade seletivamente maior significa que o variante de Fc possui maior afinidade para $Fc\gamma RIIb$ em relação à ativação dos receptores em relação à principal Fc polipeptídeo, mas reduziu a afinidade para o receptor de ativação (s) em relação ao polipeptídeo Fc principal, ou significa que o variante de Fc possui maior afinidade para ambos $Fc\gamma RIIb$ e a ativação dos receptores em relação ao polipeptídeo Fc principal, porém a maior afinidade é maior para $Fc\gamma RIIb$ do que para os receptores de ativação. Em modalidades alternativas, os variantes de Fc reduzem ou removem a ligação a um ou mais a um ou mais $Fc\gamma R$ s de ativação, reduzem ou removem a ligação a uma ou mais proteínas de complemento, reduzem ou removem uma ou mais funções de execução mediadas por $Fc\gamma R$ de ligação e / ou reduzem ou removem uma ou mais funções efetoras mediadas pelo complemento.

A presença de diferentes formas polimórficas de $Fc\gamma R$ s prevê ainda um outro parâmetro que afeta a utilidade terapêutica das variantes de Fc divulgadas aqui. Considerando a especificidade e seletividade de um dado variante de Fc para as diferentes classes de $Fc\gamma R$ s afetam significativamente a capacidade de um variante de Fc para atingir um dado antígeno para o tratamento de determinada doença, a especificidade ou seletividade de um variante de Fc para diferentes formas polimórficas destes receptores pode, em parte, determinar que a investigação ou experimentação pré-clínica, pode ser apropriada para testes e, finalmente, determinar que populações de pacientes podem ou não responder ao

tratamento. Assim, a especificidade ou seletividade de variantes de Fc aqui divulgados para os polimorfismos de receptores de Fc, incluindo, mas não limitado a, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa, e similares, podem ser usados para orientar a seleção de experimentos de pesquisas e experiências pré-clínicas válidas, projetos do ensaio clínico, seleção dos pacientes, dependência de dosagem e / ou outros aspectos que envolvem ensaios clínicos.

Variantes de Fc divulgados neste documento podem incluir modificações que modulam a interação com os receptores de Fc diferentes de Fc γ Rs, incluindo, mas não limitado a proteínas de complemento, FcRn, e homólogos de receptores de Fc (FcRHs). FcRHs incluem, mas não estão limitados a, FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, e FcRH6 (Davis *et al.*, 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Um parâmetro importante que determina a seletividade mais benéfica de uma variante de Fc administrado para tratar uma determinada doença é o contexto da variante de Fc. Assim, a seletividade do receptor de Fc ou a especificidade de um dado variante de Fc irá fornecer propriedades diferentes, dependendo se compõe um anticorpo, fusão de Fc, ou variantes de Fc com um parceiro de fusão acoplado. Em uma modalidade, uma especificidade do receptor de Fc da variante de Fc aqui divulgada irá determinar a sua utilidade terapêutica. A utilidade de uma determinada variante de Fc para fins terapêuticos depende da forma do epítopo ou forma do antígeno-alvo e da doença ou da indicação a seres tratadas. Para algumas metas e indicações, maior afinidade de Fc γ RIIb e reduzida ativação de funções de executor mediadas por Fc γ RIIb podem ser benéficas. Para outros antígenos alvo e aplicações terapêuticas, pode ser benéfico aumentar a afinidade para Fc γ RIIb ou aumentar a afinidade em ambos o Fc γ RIIb e os receptores de ativação.

Meios para otimizar a atividade de anticorpos anti-IgE

Aqui são descritos meios para alterar a afinidade para um ou mais Fc γ Rs. Em uma modalidade preferida, a afinidade é alterada para o receptor de inibição de Fc γ RIIb, alterando assim a capacidade da imunoglobulina de mediar um ou mais funções efetoras de inibição mediadas por Fc γ RIIb. Meios da invenção incluem modificações de aminoácidos (por exemplo, meios de posicionamento para otimizar a função, meios de substituição para a função de otimização etc.) e as modificações de glicofoma (por exemplo, meios para modificações de glicofoma).

Modificações de aminoácidos

São divulgados neste, imunoglobulinas que incluem modificações de aminoácidos, em que tais modificações alteram a afinidade para um ou mais Fc γ Rs. Preferencialmente, tais modificações de aminoácidos melhoram a afinidade para

Fc γ RIIb. No entanto, em algumas modalidades, as modificações podem melhorar afinidade com um ou mais receptores de ativação, por exemplo Fc γ RI, Fc γ RIIa, e Fc γ RIIIa. Modificações para alterar a ligação a Fc γ Rs são descritas em USSN 11/124, 620, depositado em 5 de maio de 2005, intitulado “Optimized Fc Variants”, e
5 USSN 12/156, 183, depositado em 30 de maio de 2008, intitulado “Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing Cells”, ambos expressamente incorporados neste por referência.

Tal como descrito aqui, os meios de posicionamento para otimizar a atividade de anticorpos anti-IgE incluem mas não estão limitados a, a modificação de um
10 aminoácido em uma ou mais posições de região constante de cadeia pesada (por exemplo, nas posições: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 e 332) o que permite a modificação das propriedades de ligação de Fc γ RIIb a imunoglobulina, função efetora, e propriedades potencialmente clínicas dos anticorpos.

Em especial, meios de substituição para a otimização da atividade de anticorpos anti-IgE, por exemplo, alterando a afinidade para Fc γ RIIb, incluem mas não estão limitados a, uma substituição de um aminoácido em uma ou mais posições de região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma substituição de um aminoácido em uma ou mais nas seguintes posições de região constante de
20 cadeia pesada: 234, 235, 236, 237, 239, 265, 266, 267, 268, 298, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331 e 332, em que numeração está de acordo com o índice da EU. Em uma modalidade, meios de substituição significam pelo menos uma (por exemplo, dois ou mais) substituição em relação a uma região de Fc principal, em que a referida modificação está em posições selecionadas do grupo que consiste de
25 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, e 332, de acordo com o índice da EU. Em uma modalidade, meios de substituição incluem uma ou mais (por exemplo, dois ou mais) substituições em posições selecionadas a partir de grupo que consiste em 235, 236, 239, 266, 267, 268, e 328, de acordo com o índice da EU.

Em uma modalidade, tais meios de substituição significam pelo menos uma substituição (por exemplo, uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionadas a partir de grupo que consiste em 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,
35 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, e 332E, em que a numeração
5 é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição são de pelo menos uma substituição (por exemplo, uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionadas a partir de grupo que consiste em 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,
10 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, e 332E, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição são de pelo menos uma substituição (por exemplo, uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionadas a partir de grupo que consiste em 234D, 234E,
15 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, e 332E, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição são de pelo menos uma substituição (por exemplo, uma ou mais substituições, duas ou mais substituições etc.) selecionadas a partir de grupo que
20 consiste em 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, e 328Y, em que a numeração é de acordo com um índice EU.

Em uma modalidade, tais meios de substituição são de pelo menos duas substituições (por exemplo, uma combinação de modificações) selecionadas a partir
25 de grupo que consiste em 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, e 328/332, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição são de
30 pelo menos duas substituições (por exemplo, uma combinação de modificações) selecionadas a partir de grupo que consiste em 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268, e 267/328, em que a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição são de pelo menos duas substituições (por exemplo, uma combinação de modificações) selecionadas a partir
35 de grupo que consiste em 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,
 5 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, e 328Y/332E, em que
 a numeração é de acordo com um índice EU.

10 Em uma modalidade, tais meios de substituição resultam em pelo menos uma
 das seguintes substituições, ou combinações de substituições: 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,
 15 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,
 20 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,
 25 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,
 30 239D/268D/328W/332E, e 239D/268D/328Y/332E, em que a numeração é de
 acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de substituição resultam
 em pelo menos uma das seguintes substituições, ou combinações de substituições:
 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,
 35 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,
5 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,
10 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, e 239D/268D/328Y/332E, em que
a numeração é de acordo com um índice EU. Em uma modalidade, tais meios de
15 substituição resultam em pelo menos uma das seguintes substituições, ou
combinações de substituições: 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,
20 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,
25 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,
30 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,
35 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, e 239D/268D/328Y/332E

Em uma modalidade, tais meios de substituição resultam em pelo menos uma das seguintes substituições, ou combinações de substituições: 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E, e 267E/328F, em que
5 a numeração é de acordo com um índice EU.

Em algumas modalidades da invenção, a imunoglobulina pode compreender meios para modificações isotípicas, ou seja, modificações em uma IgG principal para o tipo de aminoácido em uma IgG alternativo. Por exemplo, uma variante IgG1/IgG3 híbrida pode ser construída por meio de substituição para substituir as
10 posições de IgG1 na região CH2 e/ou CH3 com os aminoácidos de IgG3 em posições onde os dois isotipos são diferentes. Assim, um variante híbrido de anticorpos IgG pode ser construído de forma que compreende um ou mais meios de substituição, por exemplo, 274Q, 276k, 300F, 339T, 356E, 358m, 384S, 392N, 397M, 422i, 435R e 436F. Em outras modalidades da invenção, um variante
15 IgG1/IgG2 híbrido pode ser construído por meio de substituição para a substituição de posições de IgG2 na região CH2 e/ou CH3 com aminoácidos de IgG1 em posições onde os dois isotipos são diferentes. Assim, um variante híbrido de anticorpos IgG pode ser construído de forma que compreende um ou mais meios de substituição, por exemplo, um ou mais das seguintes subestações de aminoácidos:
20 233E, 234L, 235L,-236G (referindo-se à inserção de uma glicina na posição 236) e 327A.

Modificações de Glicofoma

Vários polipeptídios, incluindo os anticorpos, são submetidos a uma variedade de modificações pós-translacionais envolvendo porções de carboidratos,
25 tais como glicosilação com oligossacarídeos. Há vários fatores que podem influenciar glicosilação. A espécie, o tecido e os tipos de células têm se mostrado importantes na forma que a glicosilação ocorre. Além disso, o ambiente extracelular, através de condições de cultura alteradas, como a concentração sérica, pode ter um efeito direto sobre a glicosilação (Lifely *et al*, 1995, *Glycobiology* 5 (8): 813-822).

30 Todos os anticorpos contêm carboidratos em posições conservadas nas regiões constantes da cadeia pesada. Cada isotipo de anticorpo tem uma variedade distinta de estruturas de carboidratos ligadas por N. Além dos carboidratos ligados à cadeia pesada, até 30% de IgG humana têm uma região Fab glicosilada. A IgG tem um carboidrato biantenário ligado por N simples em Asn297 do domínio CH2. Para
35 IgG tanto de soro ou produzido *ex vivo* em hibridomas ou células de engenharia, as IgG são heterogêneas em relação ao carboidrato ligado a Asn297 (Jefferis *et al*.

1998, Immunol. Rev. 163:59-76; Wright *et al*, 1997, Trends Biotech 15:26-32).. Para IgG humana, o oligossacarídeo central consiste normalmente em GlcNAc₂Man₃GlcNAc, com diferentes números de resíduos externos.

As porções de carboidratos de imunoglobulinas divulgadas aqui serão descritas com referência à nomenclatura comumente utilizada para a descrição de oligossacarídeos. Uma revisão da química de carboidratos, que usa essa nomenclatura é encontrada em Hubbard *et al*. 1981, Ann. Rev. Biochem. 50:555-583. Esta nomenclatura inclui, por exemplo, Man, que representa manose; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglicosamina; Gal que representa galactose; Fuc que representa fucose e Glc, que representa glicose. Os ácidos siálicos são descritos pela notação abreviada NeuNAc, para o ácido 5-N-acetilneuramínico e NeuNGc para 5-glicolineuraminico.

A "glicosilação" significa a anexação de oligossacarídeos (carboidratos, contendo dois ou mais açúcares simples ligados entre si, por exemplo, de dois a cerca de doze açúcares simples ligados entre si) a uma glicoproteína. As cadeias laterais de oligossacarídeos geralmente são ligadas na estrutura da glicoproteína, tanto através de ligações N ou O. Os oligossacarídeos de imunoglobulinas divulgados aqui que geralmente ocorrem estão ligados a um domínio CH₂ de uma região Fc como oligossacarídeos ligados por N. "Glicosilação ligada por N" se refere a anexação da porção de carboidrato em um resíduo de asparagina in a cadeia de glicoproteína. As pessoas versadas na técnica reconhecerão que, por exemplo, cada um dos domínios de CH₂ IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murinos, bem como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humanos tem um local único para a glicosilação ligada por N em resíduo de aminoácido 297 (Kabat *et al*. Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991).

Para os propósitos do presente documento, uma "estrutura central madura de carboidratos" se refere a uma estrutura central de carboidratos processados anexado a uma região Fc, que geralmente consiste na seguinte estrutura de carboidratos GlcNAc (Fucose)-GlcNAc-Man (Man-GlcNAc)₂ típica de oligossacarídeos biantenários. A estrutura do núcleo maduro carboidrato está ligada à região Fc da glicoproteína, em geral, através do N ligação para Asn297 de um domínio CH₂ da região Fc.

Um "GlcNAc de bissecção" é um resíduo de GlcNAc anexado em β 1,4 manose da estrutura de carboidrato central maduro. O GlcNAc de bissecção pode ser enzimaticamente anexado na estrutura de carboidrato central maduro por uma enzima β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferase III (GnTIII). As células CHO não

expressam normalmente GnTIII (Stanley *et al.*, 1984, J. Biol. Chem. 261:13370-13378), mas podem ser projetados para tal (Umana *et al.*, 1999, Nature Biotech. 17:176-180).

São descritos no presente documento variantes Fc que compreendem glicofomas modificadas ou glicofomas engenheiradas. Pelos termos “glicofoma modificada” ou “glicofoma engenheirada” conforme usados no presente, isto significa que uma composição de carboidrato que está covalentemente ligada a uma proteína, por exemplo, um anticorpo, em que tal composição de carboidrato é quimicamente diferente da proteína principal. Glicofomas engenheiradas pode ser útil para uma variedade de propósitos, incluindo, mas não limitado ao aumento ou redução função efetora mediada por FcγR-. Em uma modalidade, as imunoglobulinas apresentadas no presente são modificadas para controlar o nível de oligossacarídeos fucosilados e/ou de bissecção que são covalentemente anexados na região Fc.

Uma variedade de métodos é bem conhecida na técnica para gerar glicofomas modificadas (Umaña *et al.*, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies *et al.*, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); (US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); (Potelligent™ technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; GlycoMAb™ glycosylation engineering technology [GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland]; todas as quais são expressamente incorporadas por referência). Essas técnicas controlam o nível de oligossacarídeos fucosilados e / ou de bissecção que são covalentemente anexados na região Fc, por exemplo, pela expressão em IgG em vários organismos ou linhagens celulares, engenheiradas ou de outro tipo (por exemplo células CHO Lec-13 ou células de hibridoma de rato YB2/0), por enzimas envolvidas na regulação da via de glicosilação (por exemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferase] e/ou β 1-4- N-acetilglucosaminyltransferase III [GnTIII]), ou pela modificação de carboidratos(s) depois que a IgG foi expressada. Outros métodos para a modificação de glicofomas das imunoglobulinas descritas aqui incluem o uso de cepas glico-engenheiradas de levedura (Li *et al.*, 2006, Nature Biotechnology 24(2):210-215), musgo (Nechansky *et al.*, 2007, Mol Immunol 44(7):1826-8), e plantas (Cox *et al.*, 2006, Nat Biotechnol 24(12):1591-7). O uso de um método particular para gerar a glicofoma modificada não se destina a restringir modalidades para aquele método. Ao invés disso, as modalidades apresentadas no presente documento englobam Variantes Fc com

glicofornas modificadas independentemente da forma como elas são produzidas.

Em uma modalidade, as imunoglobulinas divulgadas no presente documento são glico-engenheiradas para alterar o nível de sialilação. Níveis elevados de glicanos Fc sialilados em moléculas de imunoglobulina G pode ter um impacto adverso na funcionalidade (Scallon *et al.*, 2007, Mol Immunol. 44(7):1524-34), e diferenças nos níveis de sialilação de Fc pode resultar em atividade antiinflamatória modificada (Kaneko *et al.*, 2006, Science 313:670-673). Como os anticorpos podem adquirir propriedades anti-inflamatórias com a sialilação de polissacarídeo central de Fc, pode ser vantajoso glicoengenheirar as imunoglobulinas divulgadas no presente documento para obter um conteúdo elevado ou reduzido de ácido siálico de Fc.

A glicofornas engenheirada tipicamente se refere ao carboidrato diferente ou oligossacarídeo; portanto, por exemplo, uma imunoglobulina pode compreender uma glicofornas endinheirada. Alternativamente, a glicofornas engenheirada pode se referir à imunoglobulina que compreende o carboidrato diferente ou oligossacarídeo.

Em uma modalidade, a composição divulgada no presente documento compreende uma variante Fc glicosilada que possui uma região Fc, em que aproximadamente 51-100% do anticorpo glicosilado, por exemplo, 80-100%, 90-100%, 95-100%, etc. do anticorpo na composição compreendem a estrutura de carboidrato central maduro que não apresenta fucose. Em outra modalidade, o anticorpo na composição tanto compreende a estrutura de carboidrato central maduro que não apresenta fucose e adicionalmente compreende ao menos uma modificação de aminoácido na região Fc. Em uma modalidade alternativa, a composição compreende uma variante Fc glicosilada que possui uma região Fc, em que aproximadamente 51-100% do anticorpo glicosilado, 80-100%, ou 90-100%, do anticorpo na composição compreende a estrutura de carboidrato central maduro que não apresenta ácido siálico. Em outra modalidade, o anticorpo na composição compreende tanto a estrutura de carboidrato central maduro que não apresenta ácido siálico e adicionalmente compreende ao menos uma modificação de aminoácido na região Fc. Ainda em outra modalidade, a composição compreende uma variante Fc glicosilada que possui uma região Fc, em que aproximadamente 51-100% do anticorpo glicosilado, 80-100%, ou 90-100%, do anticorpo na composição compreende a estrutura de carboidrato central maduro que contém ácido siálico. Em outra modalidade, o anticorpo na composição compreende tanto a estrutura de carboidrato central maduro que contém ácido siálico e adicionalmente compreende ao menos uma modificação de aminoácido na região Fc. Em outra modalidade, a combinação da glicofornas engenheirada e a modificação de

aminoácido fornecem propriedades de ligação do receptor de Fc ideais para o anticorpo.

Outras Modificações

As imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem compreender
5 uma ou mais modificações que fornecem propriedades ideais que não estão
especificamente relacionadas com Fc γ R ou função efetora complementar mediada
por se. Tais modificações podem ser a modificação de aminoácidos, ou podem ser
modificações que são feitas enzimaticamente ou quimicamente. Tais modificações
10 geralmente fornecem alguma melhoria na imunoglobulina, por exemplo, um reforço
na estabilidade, solubilidade, funcionalidade ou uso clínico. Estão divulgadas no
presente documento uma variedade de melhorias que podem ser feitas pelo
acoplamento das imunoglobulinas divulgadas no presente documento com
modificações adicionais.

Em uma modalidade, a região variável de um anticorpo divulgado no
15 presente documento pode ser de afinidade madura, isso que quer dizer que a
modificação de aminoácidos foi feita nos domínios VH e/ou VL do anticorpo para
reforçar a ligação do anticorpo no seu antígeno alvo. Tais tipos de modificações
podem melhorar a cinética de associação e/ou de dissociação para ligação no seu
antígeno alvo. Outras modificações incluem aquelas que aprimoram a seletividade
20 para o antígeno alvo contra alvos alternativos. Essas incluem as modificações que
aprimoram a seletividade para os antígenos expressos no alvo contra células não
alvo. Outras melhorias para as propriedades de reconhecimento do alvo podem ser
fornecidas por meio de modificações adicionais. Tais propriedades podem incluir,
mas não estão limitadas à, propriedades específicas de cinética (isto é, cinética de
25 associação e dissociação), seletividade para um alvo em particular contra alvos
alternativos, e seletividade para uma forma específica de alvo contra formas
alternativas. Os exemplos incluem variantes completos contra divididos, superfície
da célula contra formas solúveis, seletividade para diferentes variantes polimórficos,
ou seletividade para as formas específicas conformacionais do antígeno alvo. As
30 imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem compreender uma ou
mais modificações que fornecem internalização reduzida ou aumentada de uma
imunoglobulina.

Em uma modalidade, as modificações são feitas para melhorar as
propriedades biofísicas das imunoglobulinas divulgadas no presente documento
35 incluindo, mas não limitadas à solubilidade, estabilidade e estado oligomérico. As
modificações podem incluir, por exemplo, substituições que fornecem mais

interações intramoleculares favoráveis na imunoglobulina como para fornecer uma maior estabilidade, ou substituição de aminoácidos apolares expostos com aminoácidos polares para maior solubilidade. Outras modificações to the imunoglobulinas descritas aqui incluem as que permitem a formação específica ou moléculas homodiméricas ou homomultiméricas. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas à dissulfetos engenheirados, bem como modificações químicas ou métodos de agregação que podem fornecer um mecanismo para gerar homodiméricas ou homomultiméricas covalentes. Modificações adicionais à variações descritas aqui incluem aquelas que permitem a formação específica ou moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionais, e/ou multifuncionais. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas à, uma ou mais substituições de aminoácido no domínio CH3, no qual as substituições reduzem a formação de homodimérica e aumentam a formação heterodimérica. As modificações adicionais incluem as modificações na dobradiça e domínio CH3s, no qual as modificações reduzem a propensão para formação de dímeros.

Em modalidades adicionais, as imunoglobulinas divulgadas no presente documento compreendem modificações que removem locais de degradação proteolítica. Estes podem incluir, por exemplo, locais de protease que reduzem os rendimentos de produção, bem como locais de protease que degradam a proteína administrada *in vivo*. Em uma modalidade, as modificações adicionais são feitas para remover locais de degradação covalente tal como a desamidação (isto é, desamidação de resíduos de glutaminil e asparaginil com os correspondentes de resíduos glutamil e aspartil), oxidação, e locais de degradação proteolítica. Os locais de desamidação que são particularmente úteis para remover aqueles que tem alta propensão para desamidação, incluindo, mas não limitado aos resíduos de asparaginil e glutamil seguidos por glicinas (motivos NG e QG, respectivamente). Em tais casos, tanto a substituição de resíduos pode reduzir significativamente a tendência para a desamidação. Os lugares comuns de oxidação incluem resíduos de metionina e cisteína. Outras modificações covalentes que podem tanto serem introduzidas ou removidas, incluem hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxil de resíduos de seril ou treonil, metilação dos grupos amino de cadeias secundárias de lisinas, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure e Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983), incorporado totalmente por referência), acetilação de amina N-terminal, e amidação de qualquer grupo carboxi C-terminal. Modificações adicionais também podem incluir, mas não estão limitadas às modificações pós-translacionais tais

como glicosilação N-ligada ou O-ligada e fosforilação.

As modificações podem incluir aquelas que aprimoram os rendimentos de expressão e/ou purificação de hospedeiros ou células hospedeiras comumente usadas para a produção biológica. Elas incluem, mas não estão limitadas à, várias
5 linhagens celulares de mamíferos (por exemplo CHO), linhagens celulares de levedura, linhagens celulares de bactérias e de plantas. As modificações adicionais incluem modificações que removem ou reduzem a habilidade das cadeias pesadas para formar ligações inter-cadeias de dissulfeto. As modificações adicionais incluem
10 modificações que removem ou reduzem a habilidade das cadeias pesadas para formar ligações intra-cadeias de dissulfeto.

As imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem compreender modificações que incluem o uso de aminoácidos não naturais incorporados usando, por exemplo, as tecnologias desenvolvidas por Schultz e colegas, incluindo mas não limitadas aos métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet.
15 20(12):625-30, Anderson *et al.*, 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(2):7566-71, Zhang *et al.*, 2003, 303(5656):371-3, e Chin *et al.*, 2003, Science 301(5635):964-7, todas incorporadas totalmente por referência. Em algumas modalidades, essas modificações permitem a manipulação de várias propriedades funcionais, biofísicas, imunológicas, ou de fabricação discutidas acima. Em modalidades adicionais, essas
20 modificações permitem uma adicional modificação química para outras finalidades. Outras modificações são contempladas no presente documento. Por exemplo, a imunoglobulina pode estar ligada em um dentre uma variedade de polímeros não protéicos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol.
25 Adicionais modificações de aminoácidos podem ser feitas para permitir modificações químicas específicas ou não específicas ou pós-translacionais das imunoglobulinas. Tais modificações incluem, mas não estão limitadas à PEGuilação e glicosilação. Específicas substituições que podem ser usadas para permitir a PEGuilação, incluem, mas não estão limitadas à introdução de novos resíduos de
30 cisteína ou aminoácidos não naturais de forma que específicas e eficientes químicas de acoplamento possam ser usadas para anexar o PEG ou outra fração polimérica de outro tipo. A introdução de locais específicos de glicosilação pode ser obtida por meio da introdução de novas sequências N-X-T/S nas imunoglobulinas divulgadas no presente documento.

35 As modificações para reduzir a imunogenicidade podem incluir modificações que reduzem a ligação de peptídeos processados derivados de uma sequência

principal para proteínas MHC. Por exemplo, a modificação de aminoácidos seria projetada de tal forma que não existe nenhum ou existe um número mínimo de epítomos imunes que são previstos para se ligarem com alta afinidade, para qualquer um dos alelos predominantes MHC. Vários métodos de identificação de epítomos de ligação de MHC em sequências de proteínas são bem conhecidos na técnica e podem ser usados para render epítomos em um anticorpo divulgado no presente documento. Veja, por exemplo, USSN 09/903.378, USSN 10/754,296, USSN 11/249,692, e todas as referências citadas aqui, que estão expressamente incorporadas por referência.

Em algumas modalidades, as imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem ser combinadas com imunoglobulinas que alteram a ligação de FcRn. Tais variantes podem fornecer propriedades farmacocinéticas aprimoradas para as imunoglobulinas. Os variante de preferência que aumentam a ligação em FcRn e/ou aumentam as propriedades farmacocinéticas incluem, mas não estão limitadas às substituições nas posições 259, 308, 428, e 434, incluindo mas não limitadas à por exemplo 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y, e 434M (PCT/US2008/088053, depositado em 22 de dezembro de 2008, chamada "Variantes Fc with Alterned Binding to FcRn", totalmente incorporada por referência). Outras variantes que aumentam ligação de Fc em FcRn incluem, mas não estão limitadas à: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton *et al.*, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton *et al.* 2006 Journal of Immunology 176:346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields *et al.*, Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(9):6591-6604, totalmente incorporada por referência), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311 S (Dall'Acqua *et al.* Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua *et al.*, 2006, The Journal of biological chemistry 281:23514-23524, totalmente incorporada por referência).

As modificações covalentes de anticorpos estão incluídas no escopo das imunoglobulinas divulgadas no presente documento, e são geralmente, mas nem sempre, realizadas pós-translacionalmente. Por exemplo, vários tipos de modificações covalentes do anticorpo são introduzidos na molécula pela reação de resíduos de aminoácidos específico do anticorpo com um agente biológico de derivação que é capaz de reagir com as cadeias secundárias selecionadas ou os resíduos N- ou C-terminais.

Em algumas modalidades, a modificação covalente dos anticorpos divulgada

no presente documento compreende a adição de uma ou mais marcações. O termo "grupo de marcação" significa qualquer marcação determinável. Em algumas modalidades, o grupo de marcação é acoplado no anticorpo por meio de braços espaçadores de vários comprimentos para reduzir o impedimento estérico potencial.

5 Vários métodos para a marcação de proteínas são bem conhecidos na técnica e podem ser usados na geração de imunoglobulinas divulgadas no presente documento.

Conjugados

Em uma modalidade, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento são "proteínas de fusão" de anticorpo, algumas vezes referidas como "anticorpos conjugados". O parceiro de fusão ou parceiro conjugado pode ser protéico ou não protéico, o último geralmente sendo gerado usando grupos funcionais no anticorpo e no parceiro conjugado. Os conjugados e parceiros de fusão podem ser qualquer molécula, incluindo compostos químicos de moléculas pequenas e polipeptídeos. Por exemplo, uma variedade de anticorpos conjugados e métodos estão descritos em Trail *et al.*, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588, inteiramente incorporado por referência. Possíveis parceiros conjugados incluem, mas não estão limitados as citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterápicos, agentes anti angiogênicos, inibidores da tirosina quinase, e outros agentes terapeuticamente ativos. Em algumas modalidades, os parceiros conjugados podem ser mais considerados como cargas, isto quer dizer que, a finalidade de um conjugado é uma distribuição com alvo do parceiro conjugado para uma célula alvo, por exemplo, uma célula de câncer, ou uma célula imunológica, por meio da imunoglobulina. Portanto, por exemplo, a conjugação de uma toxina de uma imunoglobulina tem com alvo a distribuição de tal toxina para as células que expressam o antígeno alvo. Como será apreciado pelas pessoas versadas na técnica, na realidade, as definições e conceitos de fusão e conjugação estão sobrepostos. A designação de um conjugado uma fusão não se destina a restringir a qualquer modalidade específica divulgada no presente documento. Ao invés disso, estes termos são usados livremente para transmitir o conceito geral de que qualquer uma das imunoglobulinas divulgadas no presente documento pode ser ligada geneticamente, quimicamente, ou de alguma outra forma, com um ou mais polipeptídeos ou moléculas para fornecer a mesma propriedade desejada.

Adequados conjugados incluem, mas não estão limitadas às marcações conforme descritas abaixo, drogas, e agentes citotóxicos incluindo, mas não limitado à, drogas citotóxicas (por exemplo, agentes quimioterápicos) ou toxinas ou

fragmentos ativos de tais toxinas. As adequadas toxinas e seus fragmentos correspondentes incluem cadeia A de difteria, cadeia A de exotoxina, cadeia A de ricina, cadeia A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina e semelhantes. Os agentes citotóxicos também incluem radioquímicos feitos pela conjugação de radioisótopos com anticorpos, ou pela ligação de um radionuclídeo com um agente quelante que foi covalentemente anexado no anticorpo. Adicionais modalidades utilizam caliqueamicina, auristatinas, geldanamicanas, maitansina, e duocarmicinas e análogos.

Em uma modalidade, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento são fundidas ou conjugadas em uma citocina. O termo "citocina" conforme usado no presente significa um termo genérico para proteínas liberadas pela população de células que atuam em outras células como intermediadores celulares. Por exemplo, conforme descrito em Penichet *et al.*, 2001, J. Immunol. Métodos 248:91-101, inteiramente incorporado por referência, as citocinas podem ser fundidas com o anticorpo para fornecer um conjunto desejado de propriedades. Os exemplos de tais citocinas são linfocinas, monocinas, e tradicionais hormônios polipeptídicos. Estão incluídos entre as citocinas os hormônios de crescimento tais como hormônio do crescimento humano, hormônio do crescimento humano N-metionil, e hormônio do crescimento bovino; hormônio paratireoide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormônios de glicoproteína tais como hormônio estimulador de folículo (FSH), hormônio estimulador da tireoide (TSH), e hormônio luteinizante (LH); fator de crescimento hepático; fator de crescimento fibroblástico; prolactina; lactogênio placentário; fator alfa e beta de necrose de tumor; substância de inibição mulleriana; peptídeo associado à gonadotropina de camundongo; inibina, ativina; fator de crescimento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); fatores de crescimento neural tais como NGF-beta; fator de crescimento plaquetário; fatores de transformação de crescimento (TGFs) tais como TGF-alfa e TGF-beta; fator de crescimento I e II tipo insulina; eritropoietina (EPO); fatores osteoindutores; interferons tais como interferon-alfa, beta, e gama; fatores de estimulação de colônia (CSFs) tais como CSF macrófago (M-CSF); CSF macrófago de granulócito (GM-CSF); e CSF granulócito (G-CSF); interleucinas (ILs) tais como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, um fator de necrose tumoral tal como TNF-alfa ou TNF-beta; C5a; e outros fatores de polipeptídeos incluindo LIF e kit ligante (KL). Conforme usado no presente, o termo citocina inclui proteínas de fontes naturais ou de cultura celular recombinante, e equivalentes biologicamente ativos das citocinas de sequência nativa.

Ainda em outra modalidade, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser conjugadas com um "receptor" (como estreptavidina) para utilização em um pré-alvo de tumor em que o conjugado receptor de imunoglobulina é administrado para o paciente, seguido pela remoção de conjugados não ligados da circulação usando um agente de limpeza e então a administração de um "ligante" (por exemplo, avidina) que é conjugado com um agente citotóxico (por exemplo, um radionucleotídeo). Em uma modalidade alternativa, a imunoglobulina é conjugada ou operavelmente ligada em uma enzima para aplicar a Terapia de Pró-droga mediada por enzima dependente de anticorpo (ADEPT). ADEPT pode ser usada pela conjugação ou ligação operável da imunoglobulina com uma enzima que ativa a pró-droga (por exemplo, um agente quimioterápico peptídil.

Quando os parceiros de imunoglobulina são usados como conjugados, os parceiros conjugados podem ser ligados em qualquer região de uma imunoglobulina divulgada no presente documento, incluindo no terminal N- ou C-, ou em algum resíduo entre a terminação. Uma variedade de ligadores pode ser útil nas imunoglobulinas divulgadas no presente documento para ligar covalentemente os parceiros conjugados com uma imunoglobulina. Os termos "ligador", "sequência de ligador", "espaçador", "sequência de ligação" ou equivalente gramaticais dos mesmos, significam aqui uma molécula ou grupo de moléculas (tais como um monômero ou polímero) que conecta duas moléculas e normalmente serve para posicionar as duas moléculas em uma configuração. Os ligadores são conhecidos na técnica; por exemplo, ligadores homo-ou hetero-bifuncionais como eles são conhecidos (veja, 1994 Pierce Chemical Company catalog, seção técnica de cross-linkers, páginas 155-200, inteiramente incorporado por referência). Várias estratégias podem ser usadas para covalentemente ligar as moléculas. Estas incluem, mas não estão limitadas á ligações de polipeptídeo entre os terminais N- e C-termini das proteínas ou domínio das proteínas, ligação via pontes de dissulfeto, e ligação via reagentes químicos de ligação cruzada. Em um aspecto desta modalidade, ligador é uma ligação de peptídeo, gerados por técnicas recombinantes ou síntese de peptídeos. O peptídeo de ligação pode incluir predominantemente os seguintes resíduos de aminoácido: Gly, Ser, Ala, ou Thr. O peptídeo de ligação deve ter um comprimento que é adequado para ligar duas moléculas de tal forma que elas assumem a conformação correta com relação uma à outra para que elas mantenham a atividade desejada. Os comprimentos adequados para esta finalidade incluem ao menos um e não mais do que 50 resíduos de aminoácidos. Em uma

modalidade, o ligador tem aproximadamente de 1 até 30 aminoácidos no comprimento, por exemplo, um ligador pode ter de 1 até 20 aminoácidos no comprimento. os ligadores úteis incluem polímeros de glicina-serina (incluindo, por exemplo, (GS) n , (GSGGS) n (Definido como SEQ ID NO:1), (GGGGS) n (Definido como SEQ ID NO:2) e (GGGS) n (Definido como SEQ ID NO:3), em que n é um inteiro de ao menos um), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina, e outros ligadores flexíveis, como poderá ser apreciado por aqueles versados na técnica. Alternativamente, uma variedade de polímeros não protéicos, incluindo, mas não limitadas à polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol, polioxialquilenos, ou copolímeros de polietileno glicol e polipropileno glicol, pode ter utilidade como ligadores.

Produção de Moléculas de co-engate

Também são divulgados no presente documento métodos para a produção e testes experimentais de moléculas de co-engate. Os métodos divulgados não se destinam a restrição de nenhuma modalidade ou aplicação particular ou teoria de operação. Ao invés disso, os métodos fornecidos têm finalidade de ilustrar genericamente que uma ou mais imunoglobulinas que podem ser produzidas e testadas experimentalmente para obter imunoglobulinas. Os métodos gerais para a biologia molecular do anticorpo, expressão, purificação, e varredura estão descritos em *Antibody Engineering*, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; e 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, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, todas incorporadas totalmente por referência.

Em uma modalidade divulgada no presente documento, são criados os ácidos nucleicos que codificam as moléculas de co-engate, e que podem ser clonadas em células hospedeiras, expressadas e ensaiadas, se desejado. Portanto, os ácidos nucleicos, e particularmente o DNA, pode ser feito para codificar cada sequência de proteína. Essas práticas são realizadas usando procedimento bem conhecidos. Por exemplo, uma variedade de métodos que pode ser útil para a geração das imunoglobulinas divulgadas no presente documento está descrita em *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), e *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons), ambos inteiramente incorporados por referência. Como será apreciado pelas pessoas versadas na técnica, a geração de sequências exatas para uma biblioteca que compreende um amplo número de sequências é potencialmente

dispendiosa e consome muito tempo. A “biblioteca” conforme usada aqui, significa um conjunto de variantes de quaisquer formas incluindo, mas não limitadas à, uma lista de sequências de ácido nucleico ou aminoácido, uma lista de substituições de ácido nucleico ou aminoácido em posições variadas, uma biblioteca física que
5 compreende ácidos nucleicos que codificam as sequências da biblioteca, ou uma biblioteca física que compreende as proteínas variantes, tanto na forma purificada ou na forma não purificada. De acordo com isso, existe uma variedade de técnicas que podem ser usadas para gerar eficientemente as bibliotecas divulgadas no presente documento. Tais métodos incluem, mas não estão limitados aos métodos
10 de montagem dos genes, métodos baseados em PCR e métodos que usam variações de PCR, métodos baseados em reação em cadeia de ligase, métodos oligo-agrupados tais como aqueles usados em transposições sintéticas, métodos de amplificação propensos a erros, e métodos que usam oligos com mutações aleatórias, clássicos métodos de metagênese em local direcionado, metagênese de
15 cassete, e outros método de amplificação e síntese de genes. Como é conhecido na técnica, existe uma variedade de kits comercialmente disponíveis e métodos para montagem de genes, metagênese, subclonagem de vetor, e semelhantes, e tais produtos comerciais podem ser úteis para a geração de ácidos nucleicos que codificam imunoglobulinas.

20 As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser produzidas através da cultura de uma célula hospedeira transformada com ácido nucleico, por exemplo, um vetor de expressão, que contém ácidos nucleicos que codificam as moléculas de co-engate, em condições adequadas para induzir ou causar a expressão da proteína. As condições apropriadas para a expressão variam
25 conforme a escolha do vetor de expressão e the célula hospedeira, e serão facilmente verificadas por uma pessoa versada na técnica através de experimentação de rotina. Uma ampla variedade de células hospedeiras adequadas pode ser usada incluindo, mas não estando limitadas às células de mamíferos, bactérias, células de insetos e leveduras. Por exemplo, uma variedade de linhagens
30 celulares que pode ser útil na geração das imunoglobulinas divulgadas no presente documento está descrita no catálogo de linhagens celulares ATCC®, disponível da *American Type Culture Collection*.

Em uma modalidade, as moléculas de co-engate são expressas em sistemas de expressão de mamíferos, incluindo sistemas nos quais os componentes de
35 expressão são introduzidos nas célula de mamíferos usando vírus tais como retrovírus ou adenovírus. Qualquer célula de mamífero pode ser usada, por

exemplo, célula de humanos, camundongos, ratos, hamster, e primatas. As células adequadas também incluem células de pesquisa conhecidas incluindo, mas não limitadas às células Jurkat T, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NS0 e variantes das mesmas. Em uma modalidade alternativa, as proteínas da biblioteca são expressas em células bacterianas. Os sistemas de expressão bacterianos são bem conhecidos na técnica e incluem *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, e *Streptococcus lividans*. Em modalidades alternativas, as imunoglobulinas são produzidas em células de inseto (por exemplo Sf21/Sf9, Trichoplusia ni Bti-Tn5b1-4) ou células de leveduras (por exemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc.). Em uma modalidade alternativa, moléculas de co-engage são expressas *in vitro* usando sistemas de translação livres de células. Os sistemas de tradução *In vitro* derivadas tanto de células procarióticas (por exemplo, *E. coli*) e eucarióticas (por exemplo, germen de trigo, reticulócitos de coelho) estão disponíveis e podem ser selecionados com base nos níveis de expressão e nas propriedades funcionais da proteína de interesse. Por exemplo, pode ser apreciado por aqueles versados na técnica, a translação *in vitro* é necessária para algumas tecnologias de exibição, por exemplo, exibição de ribossoma. Além disso, as imunoglobulinas podem ser produzidas por métodos de síntese química métodos. inclusive, os sistemas de expressão transgênicos tanto de animais (por exemplo, leite de vaca, ovelha ou cabra, ovos galados, larvas de insetos completas, etc.) e de plantas (por exemplo milho, tabaco, lentilhas d'água, etc.)

Os ácidos nucleicos que codificam as moléculas de co-engage divulgadas no presente documento podem ser incorporados em um vetor de expressão para expressar a proteína. Uma variedade de vetores de expressão pode ser usada para a expressão da proteína. Os vetores de expressão podem compreender vetores auto-replicantes extra-cromossomal ou vetores que se integram em um genoma hospedeiro. Os vetores de expressão são construídos para serem compatíveis com o tipo de célula hospedeira. Portanto, os vetores de expressão que possuem uso na geração das imunoglobulinas descritas aqui incluem, mas não estão limitados àqueles que permitem a expressão de proteínas em células de mamíferos, bactérias, células de insetos, levedura, e sistemas *in vitro*. Como é conhecido na técnica, uma variedade de vetores de expressão está disponível comercialmente ou de outra maneira, que pode ser útil para a expressão das moléculas de co-engage divulgadas no presente documento.

Os vetores de expressão tipicamente compreendem uma proteína

operavelmente ligada com sequências de controle ou reguladoras, marcadores selecionáveis, quaisquer parceiros de fusão, e/ou elementos adicionais. “operavelmente ligado” no presente significa que o ácido nucleico é posicionado em uma relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Geralmente esses

5 vetores de expressão incluem um ácido nucleico regulador transcricional e translacional operavelmente ligado em um ácido nucleico que codifica a molécula de co-engate, e são tipicamente adequados para a célula hospedeira usada para expressar a proteína. De forma geral, as sequências reguladoras transcricionais e

10 translacionais podem incluir sequências promotoras, locais de ligação ribossômica, início transcricional e sequências de parada, e sequências de reforço ou ativação. Como também é conhecido na técnica, os vetores de expressão contêm tipicamente um gene de seleção ou marcador que permite a seleção de células hospedeiras transformadas que contêm o vetor de expressão. Os genes de seleção são bem conhecidos na técnica e variam de acordo com a célula hospedeira usada.

15 As moléculas de co-engate podem ser operavelmente ligadas em um parceiro de fusão para permitir a definição do alvo da proteína expressada, purificação, varredura, exibição e semelhantes. Os parceiros de fusão podem ser ligados na sequência de imunoglobulina por meio das sequências de ligadores. The sequência de ligador geralmente compreenderá uma pequena quantidade de

20 aminoácidos, tipicamente menos do que dez, apesar de que ligadores maiores também podem ser usados. Tipicamente, as sequências de ligadores para serem flexíveis e resistentes à decomposição. Como será apreciado pelas pessoas versadas na técnica, qualquer um dentre uma variedade de sequências pode ser usada como ligador. Por exemplo, uma sequência comum de ligador compreende a

25 sequência de aminoácido GGGGS. Um parceiro de fusão pode ter um alvo ou ser uma sequência de sinal que direciona a imunoglobulina e quaisquer uns dos parceiros de fusão associados com um local celular desejado ou com o meio extracelular. Como é conhecido na técnica, certas sequências de sinalização podem ter como alvo uma proteína que pode tanto ser secretada no meio de cultivo, ou no

30 espaço periplásmico, localizado entre a membrana interna e externa da célula. Um parceiro de fusão também pode ser uma sequência que codifica um peptídeo ou uma proteína que permite a purificação e/ou varredura. Tais parceiros de fusão incluem, mas não estão limitados aos rótulos de polihistidina (rótulo His) (por exemplo H₆ e H₁₀ ou outros rótulos para uso com sistemas de Cromatografia por

35 afinidade de Metais Imobilizados (IMAC) (por exemplo, colunas por afinidade Ni⁺²)), fusões GST, fusões MBP, rótulo Strep, sequência alvo de biotinylação BSP de

enzima bacteriana BirA, e rótulos de epítipo que são os alvos para os anticorpos (por exemplo rótulos c-mic, rótulos flag, e semelhantes). Como será apreciado pelas pessoas versadas na técnica, tais rótulos podem ser úteis para purificação, para varredura, ou ambos. Por exemplo, uma imunoglobulina podem ser purificada usando um rótulo His com a imobilização do mesmo em uma coluna por afinidade de Ni^{+2} e então depois da fter purificação o mesmo rótulo His pode ser usado para imobilizar o anticorpo para uma placa revestida com Ni^{+2} para a realização de um teste ELISA ou outro ensaio de ligação (conforme descrito abaixo). Um parceiro de fusão pode permitir o uso de um método de seleção para faer a varredura nas imunoglobulinas (veja abaixo). Os parceiros de fusão que possibiulitam vários métodos de seleção são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pela fusão de membros de uma biblioteca de imunoglobulina com uma proteína do gene III, a tecnologia de *phage display* pode ser aplicada (Kay *et al.*, Phage display of peptides e proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30:10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228:1315-1317, inteiramente incorporado por referência). Os parceiros de fusão podem permitir que as imunoglobulinas sejam marcadas. Alternativamente, um parceiro de fusão pode se ligar em uma sequência específica no vetor de expressão, permitindo que o parceiro de fusão e a imunoglobulina associada sejam ligados covalentemente ou não covalentemente com o ácido nucleico que os codifica. Os métodos para a introdução de ácido nucleico exógeno dentro das células hospedeiras são bem conhecidos na técnica, e variam de acordo com a célula hospedeira usada. As técnicas incluem, mas não estão limitadas à transfecção mediada por dextrano, precipitação de fosfato de cálcio, tratamento com cloreto de cálcio, transfecção transfecção mediada por polibreno, fusão de protoplastos, eletroporação, infecção viral ou por fagos, encapsulamento de polinucleotídeos em lipossomas, e microinjeção direta do DNA em núcleos. No caso de células de mamíferos, a transfecção pode ser transitória ou estável. Em uma modalidade, as moléculas de co-engate são purificadas ou isoladas depois da expressão. As proteínas podem ser isoladas ou purificadas de várias formas conhecidas por pessoas versadas na técnica. Os métodos de purificação padrão incluem técnicas cromatográficas, incluindo troca iônica, interação hidrofóbica, afinidade, dimensionamento ou filtragem com gel, e de fase reversa, realizadas sob pressão atmosférica ou sob alta pressão usando sistemas como FPLC e HPLC. Os métodos de purificação incluem também as técnicas eletroforéticas, imunológicas, de precipitação, diálise e cromatofocalização. As técnicas de ultrafiltração e diafiltração, em conjunto com a

concentração de proteína, também são úteis. Como é bem conhecida na técnica, uma variedade de proteínas naturais liga Fc e anticorpos, e essas proteínas podem ser úteis para a purificação das imunoglobulinas divulgadas no presente documento. Por exemplo, as proteínas bacterianas A e G se ligam na região Fc. De forma semelhante, a proteína bacteriana L se liga na região Fab de alguns anticorpos, como é claro faz o alvo do antígeno do anticorpo. A purificação pode ser normalmente viabilizada por um particular parceiro de fusão. Por exemplo, as imunoglobulinas podem ser purificadas usando resina glutathione se uma fusão GST fusion for empregada, cromatografia por afinidade de Ni⁺² se um rótulo His for usado, ou anticorpo anti-flag imobilizado se uma etiqueta flag for usada. Para orientações gerais sobre adequadas técnicas de purificação, veja, por exemplo, Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994, inteiramente incorporado por referência. O grau de purificação necessário irá variar dependendo da varredura ou do uso de imunoglobulinas. Em algumas circunstâncias, nenhuma purificação é necessária. Por exemplo, em uma modalidade se as imunoglobulinas são secretadas, a varredura pode ser realizada diretamente a partir do meio. Como é bem conhecido na técnica, alguns métodos de seleção não envolvem a purificação de proteínas. Portanto, por exemplo, se uma biblioteca de imunoglobulinas é transformada em uma biblioteca de tecnologia phage display, a purificação de proteína pode não ser necessária.

Experimentação *In Vitro*

As moléculas de co-engate podem ser submetidas à varredura usando uma variedade de métodos, incluindo, mas não limitada àquelas que utilizam ensaios *in vitro*, *in vivo* e ensaios baseados em células, e tecnologias de seleção. As tecnologias de automação e de varredura de alto rendimento podem ser utilizadas nos procedimentos de varredura. A varredura pode utilizar um parceiro de fusão ou um rótulo. O uso de parceiros de fusão foi discutido acima. Com o termo "rótulo", aqui usado, significa que as imunoglobulinas divulgadas no presente documento possuem um ou mais elementos, isótopos ou compostos químicos anexados para permitir a detecção em uma varredura. De forma geral, os rótulos ficam em três classes: a) rótulos imunológicos, que podem ser um epítipo incorporado como um parceiro de fusão que é reconhecido por um anticorpo, b) rótulos isotópicos, que podem ser radioativos ou isótopos pesados, e c) rótulos de molécula pequena, que podem incluir tingimentos fluorescentes e colorimétricos, ou moléculas tasi como biotina que permite outros métodos de marcação. Os rótulos podem ser incorporados nos compostos em qualquer posição e podem ser incorporados *in vitro*

ou *in vivo* durante expressão de proteína.

Em uma modalidade, as propriedades funcionais e / ou biofísicas de moléculas de co-engate são submetidas à varredura em um ensaio *in vitro*. Os ensaios *In vitro* podem disponibilizar uma ampla variação dinâmica par as

5 propriedades da varredura de interesse. As propriedades que podem ser submetidas à varredura incluem, mas não estão limitadas à estabilidade, solubilidade, e afinidade para ligantes de Fc, por exemplo, FcγRs. Múltiplas propriedades podem ser submetidas à varredura simultaneamente ou individualmente. As proteínas podem ser purificadas ou não purificadas,

10 dependendo dos requerimentos do ensaio. Em uma modalidade, a varredura é um ensaio de ligação qualitativa ou quantitativa para a ligação das f moléculas de co-engate com uma proteína ou uma molécula não proteína que é conhecida, ou que é prevista para se ligar com a molécula de co-engate. Em uma modalidade, a varredura é um ensaio de ligação para medir a ligação com o antígeno alvo. Em

15 uma modalidade alternativa, a varredura é um ensaio para ligação de moléculas de co-engate com um ligante de Fc incluindo, mas não estando limitada à família de FcγRs, o receptor neonatal FcRn, a proterina complementar C1q, e as proteínas bacterianas A e G. Os ligantes de Fc podem ser de qualquer organismo. Em uma modalidade, os ligantes de Fc são para humanos, camundongos, ratos,

20 coelhos e / ou macacos. Os ensaios de ligação podem ser realizados usando uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo mas não limitados aos ensaios baseados em FRET (Transferência de Energia por Ressonância Fluorescente) e BRET (Bioluminescência de Transferência de Energia de Ressonância), AlphaScreen™ (Ensaio Homogêneo de Proximidade Luminescente Amplificada), Ensaio de Proximidade de Cintilação, ELISA (ensaio imunosorbente ligado à enzimas), SPR (ressonância plasmônica de superfície, também conhecida como BIACORE®), Calorimetria de Titulação Isotérmica, Varredura Diferencial de Calorimetria, eletroforese em gel e cromatografia incluindo filtração em gel. Estes e outros métodos podem tirar vantagem de alguns parceiros de fusão ou rótulo de

30 imunoglobulina. Os ensaios podem aplicar uma variedade de métodos de detecção incluindo, mas não limitados aos rótulos cromogênicos, fluorescentes, luminescentes ou isotópicos.

As propriedades biofísicas das moléculas de co-engate, por exemplo, estabilidade e solubilidade, podem ser testadas usando uma variedade de métodos

35 conhecidos na técnica. A estabilidade da proteína pode ser determinada através da medição do equilíbrio termodinâmico entre estados dobrados ou não dobrados. Por

exemplo, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser não dobradas usando desnaturante químico, aquecimento ou pH, e esta transição pode ser monitorada usando métodos incluindo, mas não limitados à, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescência, 5 espectroscopia de absorção, Espectroscopia de RMN, calorimetria, e proteólise. Como serão apreciados pelas pessoas versadas na técnica, os parâmetros cinéticos das transições de dobramento e desdobração também podem ser monitorados usando essas e outras técnicas. A solubilidade e integridade geral da estrutura de uma molécula de co-engate podem ser determinadas quantitativamente ou 10 qualitativamente usando uma vasta gama de métodos são conhecidos na técnica. Métodos que podem ser úteis para a caracterização das propriedades biofísicas das moléculas de co-engate descritas aqui incluem eletroforese em gel, focalização isoelétrica, eletroforese capilar, cromatografia tal como cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de troca iônica, e cromatografia de fase reversa em 15 líquido de alta performance, mapeamento de peptídeo, mapeamento de oligossacarídeo, espectrometria de massa, espectroscopia de absorção ultravioleta, espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetria de titulação isotérmica, varredura diferencial de calorimetria, ultra-centrifugação analítica, espalhamento de luz dinâmico, proteólise, e ensaios de ligação cruzada, 20 turbidez, e de retardamento do filtro, ensaios imunológicos, ensaios de ligação de tingimentos fluorescentes, ensaios de tingimento de proteína, microscopia, e detecção de agregados através de ELISA ou outro ensaio de ligação. A análise estrutural aplicando técnica de cristalografia por raios X e espectroscopia por RMN também podem ser úteis. Em uma modalidade, a estabilidade e/ou a solubilidade 25 pode ser medida pela determinação da quantidade de solução de proteína após um determinado período de tempo. Neste ensaio, a proteína pode ou não ser exposta à algumas condições extremas, como por exemplo, temperatura elevada, baixo pH, ou a presença de um desnaturante. Como a funcionalidade tipicamente requer uma proteína estável, solúvel e / ou bem-dobrada / estruturada, os ensaios funcionais e 30 de ligação citados acima também fornecem formas para realização de tal medição. Por exemplo, uma solução que compreende uma imunoglobulina poderia ser ensaiada quanto a sua capacidade de ligar o antígeno alvo, e então exposta à temperatura elevada por um ou mais períodos de duração determinada, e então ensaiadas quanto à sua capacidade de ligação do antígeno alvo novamente. Como 35 se espera que a proteína não dobrada e agregada não seja capaz de ligar o antígeno, a quantidade de atividade remanescente fornece uma medição da

estabilidade e da solubilidade da molécula de co-engate.

Em uma modalidade, as moléculas de co-engate podem ser testadas usando um ou mais ensaios baseados em células ou ensaios *in vitro*. Para tais ensaios, as imunoglobulinas, purificadas ou não purificadas, são tipicamente adicionadas

5 exogenamente de forma que as células são expostas às variantes individuais ou grupos de variantes que pertencem à biblioteca. Esses ensaios são tipicamente, mas nem sempre, baseados na biologia da capacidade da imunoglobulina de se ligam no antígeno alvo e mediar algum evento bioquímico, por exemplo, funções efectoras como a lise celular, fagocitose, inibição de ligação ligante / receptor,

10 inibição do crescimento e / ou proliferação, apoptose e semelhantes. Tais ensaios muitas vezes envolvem ao monitoramento da resposta das células à imunoglobulina, por exemplo, sobrevivência celular, morte celular, fagocitose celular, a lise celular, a mudança na morfologia celular, ou ativação transcricional, como expressão de um gene celular natural ou gene repórter. Por exemplo, tais

15 ensaios podem medir a capacidade de moléculas de co-engate para elicitar ADCC, ADCP ou CDC. Para alguns ensaios, adicionais células ou componentes, além das células alvo, podem precisar serem adicionadas, por exemplo, complemento sérico, ou células efectoras tais como monócitos do sangue periférico (PBMCs), células NK, macrófagos e semelhantes. Tais células adicionais podem ser de qualquer

20 organismo, por exemplo, humanos, camundongos, ratos, coelhos e macacos. Os anticorpos de ligação cruzada ou monoméricos podem causar apoptose de certas linhagens celulares expressando o antígeno alvo do anticorpo, ou pode mediar o ataque em células alvo por células imonológicas que podem ter sido adicionadas no ensaio. Os métodos para o monitoramento da morte celular ou variabilidade são

25 conhecidos na técnica, e incluem o uso de corantes, fluoróforos, reagentes imunoquímicos, citoquímicos e radioativos. Por exemplo, ensaios de caspase ou conjugados de anexina-flúor podem permitir que a apoptose seja medida, e absorção ou liberação de substratos radioativos (por exemplo, ensaios de liberação de Crómio-51) ou a redução metabólica de corantes fluorescentes, tais *como alamar*

30 *blue*, podem permitir que o crescimento celular, proliferação ou ativação sejam monitorados. Em uma modalidade, o ensaio de citotoxicidade baseados em EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA) é usado. Alternativamente, células-alvo danificadas ou mortas podem ser monitoradas através da medição da liberação de uma ou mais proteínas intracelulares naturais, por exemplo, lactato desidrogenase. A ativação

35 transcricional pode também servir como um método para avaliar a função em ensaios baseados em células. Neste caso, a resposta pode ser monitorada através

do ensaio por genes naturais ou por proteínas que podem ser reguladas ascendentemente ou descendentemente, por exemplo, a liberação de certas interleucinas pode ser medida, ou alternativamente a leitura pode ser feita via um constituinte de luciferase ou repórter GFP. Os ensaios baseados em células podem também envolver a medição das alterações morfológicas das células como uma resposta da presença de uma imunoglobulina. Os tipos de células de tais ensaios podem ser procarióticas ou eucarióticas, e uma variedade de linhagens celulares que são conhecidas na técnica podem ser usadas. Alternativamente, as verreduras baseadas em células são realizadas usando células que foram transformadas ou transfectadas com ácidos nucleicos que codificam as moléculas de co-engate.

Os ensaios *In vitro* incluem, mas não estão limitados aos ensaios de ligação, ADCC, CDC, citotoxicidade, proliferação, liberação de peróxido / ozônio, quimiotaxia de células efectoras, inibição de tais ensaios por anticorpos de função efectora reduzida; intervalos de atividades tais como >100x de aumento ou >100x de redução, misturas de ativação do receptor e os resultados dos ensaios que são esperados a partir dos perfis de tais receptores.

Experimentação *In vivo*

As propriedades biológicas das moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser caracterizadas nos experimentos em células, tecidos e no organismo inteiro. Como já é conhecido na técnica, as drogas são frequentemente testadas em animais incluindo, mas não limitados à camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, porcos e macacos, a fim de medir a eficácia da droga para o tratamento contra em doença ou um modelo de doença, ou para medir a farmacocinética da droga, toxicidade, ou outras propriedade. Tais animais podem ser referidos como modelos de doença. Com respeito às moléculas de co-engate divulgadas no presente documento, um desafio particular surge quando se utiliza modelos animais para avaliar o potencial de eficácia em humanos de polipeptídeos candidatos – isto ocorre devido, ao menos em parte, ao fato de que as moléculas de co-engate que têm um efeito específico sobre a afinidade para um receptor humano de Fc pode não ter um efeito semelhante de afinidade com o receptor ortólogo do animal. Esse problemas podem ainda ser exacerbados pelas inevitáveis ambiguidades associadas com a correta designação de ortólogos verdadeiros (Mechetina *et al.*, *Immunogenetics*, 2002 54:463–468, inteiramente incorporado por referência), e ao fato de que alguns ortólogos simplesmente não existem no animal (por exemplo humanos possuem um FcγRIIIa enquanto que os ratos não possuem). Os agentes terapêuticos são geralmente testados em camundongos incluindo, mas

não limitados às cepas de camundongo NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN e transgênicas (incluindo *knockins* e nocautes). Tal camundongo pode desenvolver várias condições autoimunes que se assemelham a órgãos humanos específicos, patologias sistêmicas autoimunes ou doenças inflamatórias tais com lúpus eritematoso sistêmico (SLE) e artrite reumatoide (RA). Por exemplo, uma imunoglobulina divulgada no presente documento destinada às doenças autoimunes pode ser testada em tais modelos de camundongos pelo tratamento do camundongo para determinar a capacidade da imunoglobulina de reduzir ou inibir o desenvolvimento de uma patologia de doença. Por causa da incompatibilidade entre o sistema receptor Fcγ de camundongo e humano, uma abordagem alternativa é usar um modelo murino SCID no qual o camundongo imuno deficiente é enxertado com PBLs ou PBMCs humanos (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) fornecendo um sistema humano com células efectoras humanas e receptores de Fcs. Em tal modelo, um desafio com antígeno (tal como o toxoide tetânico) ativa as células B para serem diferenciadas nas células do plasma e secretar imunoglobulinas, portanto, reconstituindo a imunidade humoral específica do antígeno. Portanto, uma imunoglobulina de alvo duplo divulgada no presente documento que especificamente se liga em IgE e FcγRIIb nas células B podem ser testadas para verificar a capacidade de inibir especificamente a diferenciação de célula B. tal experimentação pode fornecer dados significantes para a determinação do potencial de tal imunoglobulina a ser usada como um agente terapêutico. Outros organismos, por exemplo, mamíferos, também podem ser usados para teste. Por exemplo, devido à sua semelhança genética com seres humanos, os macacos podem ser adequados modelos terapêuticos e, portanto, pode ser usada para testar a eficácia, toxicidade, farmacocinética, ou outra propriedade das imunoglobulinas divulgadas no presente documento. Os testes das imunoglobulinas divulgados no presente documento nos seres humanos são, em última análise, necessários para a aprovação como drogas, e assim, é claro que essas experiências são contempladas. Portanto, as imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem ser testadas em humanos para determinar e sua eficiência terapêutica, toxicidade, farmacocinética e / ou outras propriedades clínicas.

As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem conferir desempenho superior em terapêuticos que contém Fc em modelos animais ou em humanos. Os perfis de ligação do receptor de tais imunoglobulinas, conforme descritos nesta especificação podem, por exemplo, ser selecionados para aumentar a potência de drogas citotóxicas ou para funções efectoras específicas para alvo ou

células efetoras para melhorar a seletividade da ação da droga. Além disso, os perfis de ligação do receptor podem ser selecionados que forma que reduzem alguma ou todas as funções efetoras, reduzindo assim os efeitos colaterais ou toxicidade de tais drogas de contém Fc. Por exemplo, uma imunoglobulina com
5 ligação reduzida para FcγRIIIa, FcγRI e FcγRIIa pode ser selecionada para eliminar a maioria das funções efetoras mediadas por célula, ou uma imunoglobulina com ligação reduzida com C1q pode ser selecionada para limitar as funções efetoras mediadas por complementos. Em alguns contextos, tais funções efetoras são conhecidas por terem potenciais efeitos tóxicos. Portanto, a eliminação deles pode
10 aumentar a segurança da droga resistente ao Fc e tal segurança aprimorada pode ser caracterizada em modelos animais. Em alguns contextos, tais funções efetoras são conhecidas por mediar à atividade terapêutica desejada. Portanto, o aprimoramento pode aumentar a atividade ou a potência da droga resistente ao Fc e tal atividade aprimorada ou potência pode ser caracterizada em modelos animais.

15 Em algumas modalidades, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser avaliadas quanto à sua eficácia em modelos animais clinicamente relevantes de várias doenças humanas. Em muitos casos, modelos relevantes incluem vários animais transgênicos para específicos antígenos e receptores.

20 Relevantes modelos transgênicos tais como aqueles que expressam o receptor humano de Fcs (por exemplo, CD32b) poderia ser usado para avaliar e testar as imunoglobulinas e fusões de Fc quanto a sua eficácia. A avaliação de moléculas de co-engate pela introdução de genes humanos que diretamente indiretamente mediam a função efetora em camundongos ou outros roedores pode
25 permitir que sejam realizados estudos fisiológicos da eficácia em distúrbios autoimunológicos e RA. Receptores humanos de Fcs tais como FcγRIIb podem compreender polimorfismos tais como aqueles no promotor de gene (-343 de G até C) ou domínio da transmembrana do receptor 187 I ou T que permitiria ainda a introdução de polimorfismos humanos específicos e combinados em roedores. Os
30 vários estudos envolvendo FcRs específicos de polimorfismo não estão limitados à esta seção, entretanto englobam todas as discussões e aplicações de FcRs de forma geral conforme especificados através deste pedido. As imunoglobulinas divulgadas no presente documento podem conferir uma atividade superior em drogas que contém Fc em tais modelos transgênicos, em particular os variantes
35 com perfis de ligação otimizados para atividade mediada por FcγRIIb humano pode apresentar atividade superior em camundongo transgênico CD32b. aprimoramento

semelhantes na eficácia em transgênicos de camundongos para outros receptores humanos de Fcs, por exemplo FcγRIIIa, FcγRI, etc., podem ser observados para moléculas de co-engate com perfis de ligação otimizados para os respectivos receptores. Transgênicos de camundongos para múltiplos receptores humanos
5 apresentariam uma atividade aprimorada para imunoglobulinas com perfis de ligação otimizados para os correspondentes múltiplos receptores.

Por causa das dificuldades e ambiguidades associadas com o uso de modelos animais para caracterizar th e eficácia potencial de candidatos de anticorpos terapêuticos em um paciente humano, alguns polipeptídeos variantes
10 divulgados no presente documento podem ser úteis como substitutos para avaliação do potencial de eficácia em humanos. Tais moléculas substitutas podem imitar – no sistema animal – o FcR e/ou a biologia complementar de uma correspondente imunoglobulina humana candidata. Esta imitação é mais propensa a se manifestar por relativas afinidades de associação entre específicas imunoglobulinas e
15 receptores animais vs. humanos. Por exemplo, se for usado um modelo animal para avaliar o potencial na eficácia em humanos de uma variante de Fc que tem uma afinidade reduzida para o FcγRIIb humano inibidor, um adequado variante substituto teria afinidade reduzida para FcγRII de camundongo. Deve ser também observado que as variantes de Fc substitutos poderiam ser criados no contexto de uma
20 variante de Fc humano, uma variante de Fc animal ou ambos.

Em uma modalidade, os testes de moléculas de co-engate podem incluir o estudo da eficácia em primatas (por exemplo, modelo de macaco caranguejeiro *cynomolgus*) para facilitar a avaliação da depleção de células-alvo específicas que abrigam o antígeno alvo. Adicionais modelos primatas incluem, mas não estão
25 limitados ao uso do macaco rhesus para avaliar os polipeptídeos de Fc em estudo terapêuticos autoimunológicos, de transplante e câncer.

Os estudos sobre a toxicidade são realizados para determinar os efeitos relacionados com o anticorpo ou fusão de Fc que não podem ser avaliados nos perfis farmacológicos padrão, ou ocorrem apenas depois da administração repetida
30 do agente. A maioria dos testes de toxicidade é realizado em duas espécies – um roedor e um não roedor – para garantir que nenhum efeito adverso inesperado seja ou não seja ignorado antes que novos agentes terapêuticos sejam introduzidas no homem. De forma geral, esses modelos podem medir uma variedade de toxicidades incluindo genotoxicidade, toxicidade crônica, imunogenicidade, toxicidade de
35 reprodutividade / de desenvolvimento e carcinogenicidade. Estão incluídos dentro dos parâmetros referidos acima a medição padrão de consumo de alimentos, peso

corporal, formação de anticorpos, química clínica, e examinação macro- e microscópica de órgãos / tecidos padrão (por exemplo, cardiotoxicidade). Os parâmetros adicionais de medição são trauma do local da injeção e medição dos anticorpos neutralizantes, se houverem. Tradicionalmente, os terapêuticos de anticorpo monoclonal, sozinhos ou conjugados são avaliados para reatividade cruzada com tecidos normais, imunogenicidade / produção de anticorpos, toxicidade do conjugado ou do ligador e toxicidade “acidental” de espécies radiomarcadas. No entanto, esses estudos podem ter que ser individualizados para abordar as preocupações específicas e seguir as diretrizes estabelecidas em ICH S6 (Os estudos de segurança para os produtos biotecnológicos, também mencionados acima). Como tal, os princípios gerais são que os produtos são suficientemente bem caracterizados, as impurezas / contaminantes foram removidas, o material de teste é comparável ao longo do desenvolvimento, a conformidade de BPL é mantida.

A farmacocinética (PK) das moléculas de co-engate divulgadas no presente documento pode ser estudada em uma variedade de sistemas animais, com o mais relevante sendo os primatas não humanos tais como os macacos cynomolgus e rhesus. Administrações i.v./s.c. isoladas ou repetidas com uma variação de dose 6000 vezes (0,05-300 mg/kg) pode ser avaliada para a meia-vida (de dias até semanas) usando a concentração plasmática e depuração. O volume de distribuição de em um estado estacionário e o nível de absorção sistêmica também pode ser medido. Os exemplos de tais parâmetros geralmente incluem a máxima concentração de plasma observada (C_{max}), o tempo para atingir a C_{max} (T_{max}), a área sobre o tempo de curva de concentração de plasma desde o tempo 0 para afinidade [AUC(0-inf)] e aparente meia vida de eliminação (T_{1/2}). Adicionais parâmetros medidos poderiam incluir a análise comportamental de dados de tempo de concentração obtidos depois da administração i.v. e biodisponibilidade.

As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem conferir uma superior farmacocinética em agentes terapêuticos que contém Fc em sistemas animais ou humanos. Por exemplo, a ligação aprimorada com FcRn pode aumentar a meia vida e a exposição da droga que contém Fc. Alternativamente, uma enfraquecida ligação com FcRn pode diminuir a meia vida e a exposição da droga que contém Fc nos casos em que a exposição reduzida é favorável bem como quando tal droga possui efeitos colaterais.

É conhecido na técnica que um conjunto de receptores de Fc é diferencialmente expressado em vários tipos de células imunológicas, bem como em diferentes tipos de tecidos. A distribuição do tecido diferencial de receptores de

Fc pode em ultimo caso ter um impacto nas propriedades farmacodinâmicas (PD) e nas propriedades farmacocinéticas (PK) das moléculas de co-engate divulgadas no presente documento. Como as moléculas de co-engate da apresentação possuem afinidades variadas para o conjunto de receptores de Fc, uma adicional varredura dos polipeptídeos para as propriedades de PD e/ou de PK podem ser extremamente úteis para definir o equilíbrio ideal de PD, PK, e da eficácia terapêutica conferida para cada um dos polipeptídeos candidatos.

Os estudos de farmacodinâmica podem incluir, mas não estão limitados à, ter como alvo célula específicas ou bloqueio dos mecanismos de sinalização, medição da inibição de anticorpos específicos para antígenos, etc. As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ter como alvo particulares de particulares células efectoras e, portanto, direcionar drogas que contém Fc para induzir certas atividades para aprimorar a potência ou para aumentar a penetração em um compartimento fisiológico particularmente favorável. Por exemplo, a atividade de neutrófilos e a localização podem ser definidas como alvo por uma molécula de co-engate que tem como alvo FcγRIIIb. Tais efeitos farmacodinâmicos podem ser demonstrados em modelos animais ou em humanos.

Uso

Uma vez que as moléculas de co-engate são feitas conforme descritas no presente documento, elas podem ser úteis em uma variedade de métodos. Em uma modalidade preferencial o método inclui o contato com uma célula que co-expressa IgE e FcγRIIb com uma molécula de co-engate de forma que ambos o IgE e FcγRIIb são ligados pela molécula de co-engate e a célula é inibida. Pelo termo “inibido” neste contexto, significa que a molécula de co-engate está evitando ou reduzindo a ativação e / ou a proliferação de IgE + células B.

As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser úteis em uma ampla variedade de produtos. Em uma modalidade as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento são terapêuticas, de diagnóstico ou um agente de pesquisa. As moléculas de co-engate podem ser úteis em uma composição que é monoclonal ou policlonal. As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser usadas para finalidades terapêuticas. Como será apreciado por aqueles versados na técnica, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser usadas para qualquer finalidade terapêutica em que os anticorpos e similares podem ser usados. As moléculas de co-engate podem ser administradas para um paciente para o tratamento de distúrbios incluindo, mas não limitados à doenças autoimunológicas e inflamatórias, doenças infecciosas e

câncer.

Um “paciente” para as finalidades descritas aqui inclui tanto humanos e outros animais, como por exemplo, outros mamíferos. Portanto, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento possuem aplicações terapêuticas tanto para humanos quanto para aplicações veterinárias. O termo “tratamento” ou “tratando” conforme divulgados no presente documento destinam-se a incluir tratamento terapêutico, bem como profilático, ou medidas supressivas para uma doença ou para um distúrbio. Portanto, por exemplo, a administração bem-sucedida de uma molécula de co-engate antes do início dos resultados da doença no tratamento de uma doença. Como outro exemplo, a administração bem-sucedida de uma molécula de co-engate otimizada depois da manifestação clínica da doença para combater os sintomas da doença compreende o tratamento de uma doença. “Tratamento” e “tratando” também englobam a administração de uma imunoglobulina otimizada depois do aparecimento de uma doença para erradicar a doença. A administração bem-sucedida de um agente depois do início, ou depois que os sintomas clínicos se desenvolveram, com possível redução dos sintomas clínicos e talvez a melhora da doença, compreende o tratamento de uma doença. Aqueles “com necessidade de tratamento” incluem mamíferos que já possuem a doença ou distúrbio, bem como aqueles que estão propensos a ter a doença ou distúrbio, incluindo aqueles em que a doença ou distúrbio deve ser prevenido.

Em uma modalidade, uma molécula de co-engate divulgada no presente documento é administrada para um paciente com uma doença que envolve a expressão imprópria de uma proteína ou outra molécula. Dentro do escopo divulgado no presente documento, isto significa que inclui doenças e distúrbios caracterizados por proteínas aberrantes por causa de, por exemplo, alterações na quantidade de proteína presente, localização da proteína, modificação pós-translacional, estado de conformação, a presença de uma proteína mutante ou patogênica, etc. de forma similar, a doença ou distúrbio pode ser caracterizado por moléculas de alteração incluindo, mas não limitadas à polissacarídeos e gangliosídeos. Uma superabundância pode ser devido a qualquer causa incluindo, mas não limitada à superexpressão em nível molecular, aparecimento prolongado ou acumulado no local de ação, ou atividade aumentada de uma proteína com relação à normal. Estão incluídas nesta definição as doenças e distúrbios caracterizados pela redução de uma proteína. Esta redução pode ser devido à qualquer causa incluindo, mas não limitada à expressão reduzida em nível molecular, aparecimento diminuído ou reduzido no local de ação, formas mutantes

de uma proteína, ou atividade reduzida de uma proteína com relação à normal. Tal superabundância ou redução de uma proteína pode ser medida com relação à sua expressão normal, aparecimento, ou atividade da proteína, e tal medição pode ter uma função importante no desenvolvimento e / ou nos testes clínicos das imunoglobulinas divulgadas no presente documento. São divulgados no presente documento os novos métodos de tratamento de distúrbios mediados por IgE, por exemplo, alergias alimentares e ambientais e asma alérgica. Em modalidades preferenciais, as doenças alérgicas que podem ser tratadas pelos produtos e métodos da invenção incluem asma alérgica e atópica, dermatite atópica e eczema, rinite alérgica, conjuntivite alérgica, e rinoconjuntivite, encefalomielite alérgica, rinite alérgica, vasculite alérgica, e choque anafilático. As alergias ambientais e alimentares que podem ser tratadas incluem alergias a ácaros de poeira, barata, gato e outros animais, polen (incluindo ambrósia, gramas-bermuda, cardo russo, carvalho, centeio, e outros), bolores e fungos (por exemplo, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* e outros), látex, picadas de insetos (abelhas, vespas e outros), penicilina e outras drogas, morangos e outras frutas e vegetais, amendoins, soja e outros legumes, nozes ou outros frutos secos, mariscos e outros frutos do mar, leite e outros produtos laticínios, trigo e outros grãos, e ovos. De fato, qualquer alergia a alimentos, alergia transmitida por ar, alergia ocupacional, ou outra alergia ambiental mediada por IgE pode ser tratada por meio de uma quantidade terapêutica dos produtos apresentados nesta invenção. Para os exemplos de alergias comuns, veja Arbes *et al.*, *Prevalences of positive skin test responses to 10 common allergens in the US population: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*, *Clinical Gastroenterology* 116(2), 377-383 (2005).

Também são divulgados testes diagnósticos para identificar os pacientes que tendem a apresentar uma resposta clínica favorável para uma molécula de co-engate divulgada no presente documento, ou que são propensos a apresentar uma resposta significativamente melhor quando tratados com uma molécula de co-engate divulgada no presente documento em contraste com um ou mais agente terapêuticos atualmente utilizados. Qualquer um dentre um número de métodos para a determinação de polimorfismos de FcγR em humanos conhecidos na técnica podem ser usados. Além disso, também são divulgados os testes prognósticos realizados nas amostras clínicas, tais como amostras de tecido e sangue. Tais testes podem ensaiar para atividade, independentemente do mecanismo. Tal informação pode ser usada para identificar pacientes para a inclusão ou exclusão em testes clínicos, ou para informar decisões com respeito às apropriadas dosagens

e regimes de tratamento. Tais informações também podem ser úteis para selecionar a droga que contém uma particular molécula de co-engate que apresenta uma atividade superior em tal ensaio.

Formulação

5 As composições farmacêuticas são contempladas em que uma molécula de co-engate divulgada no presente documento e um ou mais agentes terapêuticamente ativos são formulados. As formulações das moléculas de co-engate divulgadas no presente documento são preparadas para armazenagem pela
10 mistura de tal imunoglobulina que possui o desejado grau de pureza com opcionais transportadores farmacêuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizadores (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980, inteiramente incorporado por referência), na forma de formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Os transportadores aceitáveis, excipientes, ou estabilizadores são não tóxicos para os que o recebem nas dosagens e concentrações utilizadas, e incluem
15 tampões tais como fosfato, acetato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina, preservantes (tais como cloreto de octadecildimetilbenzil amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil orbenzil álcool; parabeno alquil, tais como parabeno metil ou parabeno propil; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e
20 m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos do que cerca de 10 resíduos); proteínas, tais como albumina sérica, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tais como polivinilpirrolidoni; aminoácidos tais como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros carboidratos incluindo glicose, manose, ou dextrinas; agentes de quelação tais como EDTA; açúcares como o manitol, sacarose, trealose ou sorbitol;
25 edulcorantes e outros agentes de sabores, preenchedores tais como celulose microcristalina, lactose, amido de milho e de outros tipos; agentes de ligação, aditivos, agentes de coloração, contra-íons formadores de sal tais como sódio; complexos metálicos (por exemplo complexos de proteína Zn); e / ou surfactantes
30 não iônicos tais como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietileno glicol (PEG). Em uma modalidade, a composição farmacêutica que compreende a imunoglobulina divulgada no presente documento pode estar em uma forma solúvel em água, como estando presentes como sais farmacêuticamente aceitáveis, o que significa a inclusão de ambos os sais de adição de ácido e base. “Sal da adição ácida
35 farmacêuticamente aceitável” se refere aos sais que retém a efetividade biológica das bases livres e que não são biologicamente ou de alguma outra forma

indesejáveis, formadas com ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido hidrobrômico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácidos fosfóricos e semelhantes, e ácidos orgânicos tais como ácido acético, ácido propiônico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malônico, ácido succínico, ácido 5 fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinâmico, ácido mandélico, ácido metanossulfônico, ácido etanosulfônico, ácido p-toluenosulfônico, ácidos salicílicos e semelhantes. “Sais de adição básica farmacologicamente aceitáveis” incluem aqueles derivados de bases inorgânicas, tais como sais de sódio, potássio, lítio, amônio, cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, 10 alumínio e semelhantes. Algumas modalidades incluem ao menos um dos sais de amônio, potássio, sódio, cálcio e magnésio salts. Os sais derivados de bases orgânicas não tóxicas farmacologicamente aceitáveis incluem sais de aminas primárias, secundárias ou terciárias, aminas substituídas incluindo aminas substituídas de ocorrência natural, aminas cíclicas e resinas básicas de trocas 15 iônicas, tais como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina e etanolamina. As formulações a serem usadas para a administração *in vivo* podem ser estéreis. Isto é rapidamente obtido pela filtração através de membranas de filtração estéreis ou outros métodos.

As moléculas de co-engate divulgadas no presente documento também 20 podem ser formuladas como imunolipossomas. Um lipossoma é uma pequena vesícula que compreende vários tipos de lipídios, fosfolipídios e / ou surfactantes que são úteis para a liberação de um agente terapêutico em um mamífero. Os lipossomas contendo a imunoglobulina são preparados por métodos conhecidos na técnica. Os componentes do lipossoma são dispostos em uma formação de duas 25 camadas, semelhante ao arranjo lipídico das membranas biológicas. Os lipossomas particularmente úteis podem ser gerados pelo método de evaporação em fase reversa com uma composição lipídica que compreende fosfatidilcolina, colesterol e fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Os lipossomas são extrusados através de filtros com tamanho dos poros definidos para render lipossomas com o 30 diâmetro desejado.

A molécula de co-engate e outros agentes terapêuticamente ativos m também podem ser presos em microcápsulas preparadas pelos métodos incluindo mas não limitados às técnicas de conservação, polimerização interfacial (por exemplo usando microcápsulas de hidroximetilcelulose ou microcápsulas de 35 gelatina, ou poli-(metilmetacrilato) microcápsulas), sistema de distribuição de drogas coloidal (por exemplo, lipossomas, microesferas de albumina, microemulsões, nano-

partículas e e nanocápsulas), e macroemulsões. Tais técnicas são divulgadas em Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980, inteiramente incorporado por referência. As preparações de liberação sustentada podem ser preparadas. Os adequados exemplos de preparações de liberação sustentada incluem matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos, cujas matrizes são artigos formados, como por exemplo, películas ou microcápsulas. Os exemplos de matrizes de liberação sustentada incluem poliésteres, hidrogéis (por exemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), ou poli(vinil álcool)), poli ácido láctico, copolímeros de L-ácido glutamínico e gama etil-L-glutamato, acetato etileno vinil não degradável, copolímeros do ácido láctico-glicólico degradável tais como Lupron Depot® (que são microesferas injetáveis compostas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico e acetato de leuprolide), ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico, e ProLease® (comercialmente disponível da Alkermes), que é um sistema de distribuição baseado em microesferas composto da desejada molécula bioativa incorporada na matriz de poli-DL-lactídeo-co-glicolíde (PLG).

Administração

A administração da composição farmacêutica compreende uma molécula de co-engate divulgada no presente documento, por exemplo, na forma de uma solução aquosa estéril, pode ser feita de variadas maneira incluindo, mas não limitadas à administração oral, subcutânea, intravenosa, intranasal, intraoticamente, transdermamente, topicamente, (por exemplo, gels, pomadas, loções, cremes, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente, vaginalmente, parenteralmente, retalmente ou intraocularmente. Em alguns casos, por exemplo, para o tratamento de feridas, inflamações, etc., a imunoglobulina pode ser diretamente aplicada como uma solução ou um spray. Como é conhecido na técnica, a composição farmacêutica pode ser formulada de acordo com isso, dependendo da maneira de introdução.

A administração subcutânea pode ser usada em circunstâncias em que o paciente pode se autoadministrar a composição farmacêutica. Muitas terapias protéicas não são suficientemente potentes para permitir a formulação de uma dose terapêuticamente eficaz no volume máximo aceitável para administração subcutânea. Esse problema pode ser em parte devido ao uso de formulações de proteínas que compreendem arginina-HCl, histidina e polissorbato. Os anticorpos divulgados no presente documento podem ser mais favoráveis à administração subcutânea, devido à, por exemplo, aumento da potência, melhor meia-vida sérica, ou solubilidade reforçada.

Como é conhecido na técnica, as proteínas terapêuticas são frequentemente liberadas por infusão intravenosa ou bolus. Os anticorpos divulgados no presente documento também podem ser fornecidos através de tais métodos. Por exemplo, a administração pode ser feita por infusão intravenosa com 0.9% de cloreto de sódio como um veículo de infusão.

A administração pulmonar pode ser feita usando um inalador ou nebulizador e a formulação compreende um agente de aerazol. Por exemplo, a tecnologia inalável de AERx® comercialmente disponível pela Aradigm, ou o sistema de liberação pode ser usado. Os anticorpos divulgados no presente documento podem ser mais amenos para a distribuição intrapulmonar. FcRn está presente nos pulmões e pode promover o transporte do pulmão até o fluxo sanguíneo (por exemplo, Syntonix WO 04004798, Bitonti *et al.* (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8, ambos inteiramente incorporado por referência). De acordo com isso os anticorpos que se ligam com FcRn mais eficientemente no pulmão ou que são liberados mais eficientemente na corrente sanguínea podem ter uma biodisponibilidade aprimorada em seguida a administração intrapulmonar. Os anticorpos divulgados no presente documento podem ser também mais amenos para a administração intrapulmonar devido à, por exemplo, solubilidade aprimorada ou ponto isoelétrico alterado.

Além disso, as moléculas de co-engate divulgadas no presente documento podem ser mais amenas para a administração oral devido à, por exemplo, estabilidade aprimorada em pH gástrico e resistência aumentada para proteólise. Além disso, FcRn parece ser expressado no epitélio intestinal de adultos, então os anticorpos divulgados no presente documento com perfil de interação com FcRn aprimorados podem apresentar biodisponibilidade realçada após a administração oral. O transporte de anticorpos mediado por FcRn também podem ocorrer nas membranas mucosas tais como aquelas nos tratos gastrointestinal, respiratório e genital.

Além disso, qualquer número de sistemas de distribuição conhecidos na técnica pode ser usado e podem ser usados para administrar os anticorpos divulgados no presente documento. Os exemplos incluem, mas não estão limitados à encapsulação em lipossomas, micropartículas, microesferas, (por exemplo, microesferas PLA/PGA), e similares. Alternativamente, um implante de um material poroso, não poroso ou gelatinoso, incluindo membranas ou fibras, pode ser usado.

Os sistemas de liberação sustentada podem compreender um material polimérico ou matriz, tais como poliésteres, hidrogéis, poli(vinil álcool), polilactídeos,

copolímeros de ácido L-glutâmico e etil-L-gutamato, acetato de etileno-vinil, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tais como Lupron Depot®, e ácido poli-D-(-)-3-hidroxiburirico. Também é possível administrar um ácido nucleico que codifica uma imunoglobulina divulgada no presente documento, por exemplo, por infecção retroviral, injeção direta, ou revestimento com lipídios, receptores da superfície celular, ou outros agentes de transfecção. Em todos os casos, os sistemas de liberação controlada podem ser utilizados para liberar a imunoglobulina em ou perto do local desejado da ação.

Dosagem

As quantidades e frequências de dosagem de administração são, em uma modalidade, selecionadas para serem terapêuticamente ou profilaticamente eficazes. Como é conhecido na técnica, ajustes para a degradação proteica, distribuição sistemática contra localizada, e taxa de síntese de nova protease, assim como a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, tempo de administração, interação medicamentosa e a gravidade da doença podem ser necessários e serão determináveis com a experimentação de rotina por aqueles versados na técnica.

A concentração da molécula de conexão terapêuticamente ativa na formulação pode variar de cerca de 0,1 a 100% em peso. Em uma modalidade, a concentração da molécula de conexão está na faixa de 0,003 a 1,0 molar. A fim de tratar um paciente, uma dose terapêuticamente eficaz da imunoglobulina divulgada aqui pode ser administrada. Por "dose terapêuticamente eficaz" aqui entende-se uma dose que produz os efeitos para os quais ela é administrada. A dose exata dependerá da finalidade do tratamento e será determinável por alguém versado na técnica usando técnicas conhecidas. As dosagens podem variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal ou maiores, por exemplo, 0,1, 1, 10 ou 50 mg/kg de peso corporal. Em uma modalidade, dosagens variam de 1 a 10 mg/kg.

Em algumas modalidades, apenas uma única dose da molécula de conexão é usada. Em outras modalidades, doses múltiplas da molécula de conexão são administradas. O tempo decorrido entre as administrações pode ser inferior a 1 hora, cerca de 1 hora, cerca de 1-2 horas, cerca de 2-3 horas, cerca de 3-4 horas, cerca de 6 horas, cerca de 12 horas, cerca de 24 horas, cerca de 48 horas, cerca de 2-4 dias, cerca de 4-6 dias, cerca de uma semana, cerca de 2 semanas, ou mais de duas semanas.

Em outras modalidades, moléculas de conexão divulgadas aqui são administradas em regimes de dosagem metronômicos, quer por infusão contínua quer por administração frequente sem períodos de descanso prolongado. Tal

administração metronômica pode envolver dosagem em intervalos constantes sem períodos de descanso. Normalmente tais regimes abrangem infusão contínua ou de baixa dose crônica por um período prolongado de tempo, por exemplo, 1-2 dias, 1-2 semanas, 1-2 meses, ou até 6 meses ou mais. O uso de doses mais baixas pode
5 minimizar os efeitos colaterais e a necessidade por de períodos de descanso.

Em certas modalidades, as moléculas de conexão aqui divulgadas e um ou mais outros agentes terapêuticos ou profiláticos são ciclicamente administrados ao paciente. A terapia em ciclos envolve a administração de um primeiro agente em uma vez, de um segundo agente em um segundo momento, opcionalmente outros
10 agentes em momentos adicionais, opcionalmente um período de descanso, e em seguida a repetição desta sequência de administração uma ou mais vezes. O número de ciclos é tipicamente de 2 a 10. A terapia em ciclos pode reduzir o desenvolvimento de resistência a um ou mais agentes, pode minimizar os efeitos colaterais, ou pode melhorar a eficácia do tratamento.

15 Terapias de Combinação

As moléculas de conexão divulgadas aqui podem ser administradas concomitantemente com um ou mais outros regimes ou agentes terapêuticos. Regimes ou agentes terapêuticos adicionais podem ser usados para tratar a mesma doença, para tratar uma complicação que a acompanhe, ou podem ser utilizados
20 para melhorar a eficácia ou a segurança da imunoglobulina

Co-terapias particularmente preferidas incluem aquelas que são aprovadas ou estão sendo avaliadas clinicamente para o tratamento de distúrbios mediados por IgE, tais como alergias e asma. Em particular, as composições terapêuticas da invenção podem ser utilizadas em combinação com anti-inflamatórios como
25 corticosteroides e/ou broncodilatadores como β 2-agonistas inalados, os dois principais grupos de medicamentos. Os corticosteroides inalados incluem fluticasona, budesonida, flunisolida, mometasona, triancinolona e beclometasona, enquanto que os corticosteroides orais incluem a prednisona, metilprednisolona e prednisolona. Outros esteroides incluem glicocorticoides, dexametasona, cortisona,
30 hidrocortisona, azulfidineicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, assim como esteroides tópicos, como antralina, calcipotrieno, clobetasol e tazaroteno. Broncodilatadores aumentam o diâmetro das vias aéreas e facilitam o fluxo para e dos pulmões. Broncodilatores que podem ser combinados com as terapias da invenção incluem broncodilatadores de curta duração, como
35 metaproterenol, efedrina, terbutalina e albuterol, e broncodilatadores de longa ação, como o salmeterol, metaproterenol e teofilina.

As terapias da invenção podem ser combinadas com fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), tais como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolac, fenoprofeno, indometacina, cetoralac, oxaprozin, nabumentona, sulindaco, tolmentin, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno e nabumetona. Co-terapias podem incluir anti-histamínicos como a loratadina, fexofenadina, cetirizina, difenidramina, maleato de clorfeniramina, clemastina e azelastina. A co-terapia pode incluir o cromoglicato, cromolina sódio e nedrocromil, assim como descongestionantes, em spray ou oral, tais como oximetazolina, fenilefrina e pseudoefedrina. As terapias da invenção podem ser combinadas com uma classe de anti-inflamatórios chamados antagonistas de receptor de leucotrieno, como pranluaste, zafirluaste e montelucaste, e inibidores da síntese de receptores de leucotrieno, como zileuton.

As terapias da invenção podem ser combinadas com outras imunoterapias, incluindo vacinas de alergia, assim como outros antagonistas de IgE ou FcεRs. As terapias da invenção podem ser combinadas com antagonistas de quimiocinas ou citocinas, incluindo, mas não limitando a anticorpos e fusões Fc, incluindo, mas não limitando a inibidores de quimiocinas CCR3, CCR4, CCR8 e CRTH2, e CCR5, e inibidores de citocinas IL-13, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-19, IL-21, família de receptores de citocinas de Classe II, IL-22, IL-23, IL-25, IL-27, IL-31 e IL-33. As terapias da invenção podem ser combinadas com os moduladores de adesão, fatores de transcrição e/ou sinalização intracelular. Por exemplo, as imunoglobulinas da invenção podem ser combinadas com os moduladores de NF-κb, AP-1, GATA-3, Stat1, Stat-6, c-maf, NFATs, supressores de sinalização de citocina (SOCS), receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPARs), MAP quinase, MAPK p38, JNK, e receptores de esfingosina 1-fosfato. As terapias da invenção podem ser administradas com tolilato de suplatast, inibidores da fosfodiesterase 4 (PDE4), bloqueadores dos canais de cálcio e moléculas semelhantes à heparina. Co-terapias possíveis para a invenção são ainda descritas detalhadamente em Caramori *et al.*, 2008, Journal of Occupational Medicine and Toxicology 3-S1-S6.

As terapias da invenção também podem ser usadas em conjunto com um ou mais antibióticos, agentes antifúngicos ou agentes antivirais. Os anticorpos divulgados aqui podem também ser combinados com outros regimes terapêuticos, como a cirurgia.

EXEMPLOS

Exemplos abaixo são fornecidos apenas para fins ilustrativos. Estes

exemplos não são destinados a restringir qualquer modalidade divulgada no presente documento a qualquer aplicação particular ou teoria da operação.

Exemplo 1. Métodos originais para inibição de IgE+ FcγRIIb+ células

Imunoglobulina IgE é um iniciador central e propagador da resposta alérgica no tecido afetado. IgE se liga ao receptor de alta afinidade para IgE (FcεRI), um receptor-chave envolvidos nas manifestações imediatas alérgicas, que se expressa em uma variedade de células efetoras, incluindo os mastócitos, basófilos, eosinófilos, bem como outros tipos de células. Ligação cruzada da FcεRI por imune-complexos IgE-ativa as células, liberando mediadores químicos como a histamina, prostaglandinas, leucotrienos e, o que pode levar ao desenvolvimento da uma reação de hipersensibilidade do tipo I. O anticorpo monoclonal aprovado Omalizumab (Xolair) neutraliza IgE ligando para ele engajamento e bloqueio com FcγR. Omalizumab reduz bioativos IgE através do sequestro, atenuando a quantidade da IgE antígeno específicas que podem ligar para o e sensibilizar as células dos tecidos basófilos e mastócitos. Essa neutralização da IgE livre circulante, por sua vez, leva a uma diminuição dos sintomas das doenças alérgicas. Curiosamente, aumentar os níveis séricos de IgE após o início da terapia por causa da formação e complexos omalizumab-IgE podem permanecer elevados até um ano após a interrupção do tratamento. Consequentemente, esse problema pode levar a resultados falso-negativos em testes de diagnóstico e, portanto, os níveis de IgE devem ser rotineiramente verificados.

Um novo método visando o caminho IgE envolve não só o bloqueio IgE livre circulante de participar FcγRs em células efetoras, mas visando a fonte da produção de IgE. IgE é secretada por células plasmáticas produtoras de IgE localizado nos gânglios linfáticos de drenagem no local de ou a entrada do antígeno localmente nos sítios de reações alérgicas. Células plasmáticas produtoras de IgE são diferenciadas a partir de células IgE B +. Classe de comutação das células B para produção de IgE é induzido por dois sinais distintos, o que pode ser fornecida por células Th2.

Existem duas formas de imunoglobulinas: a membrana e secretadas forma ancoradas. A forma de membrana ancorada difere da forma segregada em que o primeiro tem um peptídeo-membrana de ancoragem que se estende do término do C da cadeia pesada. Imunoglobulina de membrana ancorada em células B, também conhecido como o receptor da célula B (BCR) complexa, é crítico para as funções de células B. Ele pode converter sinais para descansar as células B a se diferenciar em ativado linfoblastos e células plasmáticas secretoras de Ig.

As células diferenciadas B expressando membrana ancoradas IgE, aqui referidas como células mlgE + B, possuem um mecanismo de retroalimentação negativa sobre o natural - a inibição do receptor de Fc Fc γ R1Ib. Fc γ R1Ib é expresso em uma variedade de células imunes, incluindo as células B, células dendríticas, monócitos, macrófagos e, onde ela desempenha um papel crucial na regulação imune. Na sua função normal das células B, Fc γ R1Ib serve como um mecanismo de feedback para modular a ativação de células B através a receptor de célula B (BCR). Engate de BCR pelo antígeno complexado imune em células B maduras ativando uma cascata de sinalização intracelular, incluindo a mobilização de cálcio, o que leva à proliferação e diferenciação celular. No entanto, como anticorpos IgG com especificidade para a antígeno são produzidos, os complexos imunes associadas (ICs) pode ligar de maneira cruzada a BCR com Fc γ R1Ib, onde a ativação da BCR é inibida pelo engate de Fc γ R1Ib e vias de sinalização intracelular associadas que interferem com os caminhos a jusante da ativação BCR. A expressão da Fc γ R1Ib na superfície das células Mogi+ B, que usam Mogi como BCR, serve como um regulador negativo desses tipos celulares.

Uma nova estratégia para inibir a doença mediada por IgE, ilustrada na Figura 1, é inibir as células IgE + B (isto é, as células B expressando membrana ancoradas IgE) por coengatando a membrana ancorada IgE e a inibição dos receptores Fc γ R1Ib. Em células B, que tem a comutação de classe para expressar IgE, mlgE serve como BCR (aqui referida como mlgE BCR). Esta abordagem potencialmente imitam o mecanismo biológico natural de supressão mediadas por imunocomplexos da ativação das células B, impedindo assim a diferenciação em células plasmáticas produtoras de IgE. Células plasmáticas produtoras de IgE residem na medula óssea e, provavelmente, têm uma vida útil das várias semanas a vários meses. Como as novas células plasmáticas secretoras de IgE passam por estágios de células mlgE-expressando B durante a diferenciação, se a sua geração é revogada, inibindo seus precursores de células mlgE+ B com o tratamento anti-IgE, as células do plasma existente vai morrer dentro de semanas a meses, e, assim, a produção da IgE também irá gradualmente diminuir. Importante, inibição de células de memória IgE + B, que carregam mlgE, também seria inibida por imunoglobulinas anti-IgE que coengatam Fc γ R1Ib com alta afinidade. Se isso ocorrer, a terapia pode ter impacto a longo prazo sobre a doença fundamental.

Exemplo 2. Anticorpos Anti-IgE com alta afinidade para Fc γ R1Ib

Sob condições fisiológicas, a ponte do BCR com Fc γ R1Ib e subsequente supressão de células e posterior B ocorre através de complexos imunes da IgG

antígeno cognato e. A estratégia do projeto era reproduzir este efeito usando um anticorpo único reticulação. IgG Humano ligando Fc γ R1Ib humano com afinidade fraca (superior a 100 nm para IgG1), e a inibição mediada Fc γ R1Ib ocorre em resposta imune-complexos, mas não IgG monomérica. Foi fundamentado que grande afinidade para este receptor (menos de 100 nM) seria necessária para a inibição máxima da ativação de células B. A fim de aumentar a atividade inibitória da anticorpos anti-de IgE da invenção, a região Fc foi projetada com variantes que melhoram a ligação de Fc γ R1Ib. Variantes Fc projetadas foram descritos que ligam ao Fc γ R1Ib com afinidade melhorada em relação a IgG1 nativa (USSN 12/156, 183, apresentado 30 de maio de 2008, intitulado "Métodos e Composições para Inibição de células expressando CD32b", aqui expressamente incorporadas por referência).

As variantes foram originalmente geradas no contexto de um anticorpo visando a antígeno CD19, um componente de regulação do complexo co-receptor BCR. A região Fv deste anticorpo é uma versão de anticorpo humanizado e amadurecido por afinidade 4G7, e é aqui referida como HuAM4G7. Os genes Fv deste anticorpo foram subclonados em um vetor de expressão mamífero pTT5 (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá). Mutações no domínio Fc foram introduzidas utilizando mutagênese direcionada por local (QuikChange, Stratagene, Cedar Creek, TX). Além disso, o controle de variantes nocautes com afinidade para receptores de Fcs ablacionada foram geradas compreendendo as substituições G236R e L328R (G236R/L328R). Esta variante é conhecida como Fc-KO ou Fc nocaute. Construções de cadeia pesada e leve foram co-transfectadas em células HEK293E de expressão, e anticorpos foram purificados utilizando cromatografia de afinidade da proteína A (Pierce Biotechnology, Rockford, IL).

Proteína recombinante humana Fc γ R1Ib para estudos de ligação foram obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN). Genes codificando Fc γ R1Ia e proteínas receptoras Fc γ R1Ia foram obtidos a partir do Coleção Gene de Mamífero (ATCC), e subclonados no vetor pTT5 (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá) contendo 6X etiquetas His. Formas alélicas dos receptores (H131 e R131 for Fc γ R1Ia e V158 e F158 para Fc γ R1Ia) foram gerados utilizando mutagênese QuikChange. Vetores codificando os receptores foram transfectadas em células HEK293T proteínas e foram purificados utilizando cromatografia de afinidade a níquel.

As variantes foram testadas para a afinidade do receptor usando a tecnologia Biacore, também conhecido como Biacore neste documento, uma ressonância de plasmon de superfície de tecnologia (SPR), com base para o estudo de interações biomoleculares em tempo real. Medições SPR foram feitas usando um instrumento

Biacore 3000 (Biacore, Piscataway, NJ). A proteína A/G (Pierce Biotechnology) chip CM5 biossensor (Biacore) foi gerada utilizando um protocolo de engate padrão de amina primária. Todas as medições foram realizadas utilizando tampão HBS-EP (10 mM HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% vol/vol surfactante P20, Biacore). Anticorpos em 20 nM ou 50 nM em tampão HBS-EP foram imobilizados sobre a superfície de proteína A/G e Fc γ Rs foram injetados. Após cada ciclo, a superfície foi regenerada pela injeção de tampão glicina (10 mM, pH 1,5). Os dados foram processados zerando o tempo de resposta e antes da injeção de Fc γ R e subtraindo os sinais adequados inespecífica (resposta de referência e canal de injeção do tampão da operação). Análises cinéticos foram realizados pelo ajuste global de associação de dados com um modelo de ligação Langmuir 1:1 Langmuir usando software BIAevaluation (Biacore).

Um conjunto representativo de sensogramas para a ligação de variantes selecionados de anticorpos anti-CD19 para Fc γ RIIb é mostrado na Figura 2. As afinidades de todas as variantes e WT (nativo) IgG1 a todos a Fc γ Rs, obtido a partir de ajustes dos dados Biacore vinculativo, são plotados na Figura 3 e desde numericamente na Figura 4. Considerando que o WT IgG1 Fc liga com Fc γ RIIb com μ M de afinidade ($K_D = 1,8 \mu$ M na Figura 4), uma série das variantes, por exemplo, G236D/S267E, S239D/S267E, e S267E/L328F, foram projetados ligando o receptor inibitório com mais força. A variante S239D/I332E, conforme descrito em USSN 11/124,620, também tem afinidade melhorada para a ativação de receptores Fc γ RIIa e Fc γ RIIIa, e portanto, é capaz de citotoxicidade melhorada mediada por anticorpo-dependente mediada por células (ADCC) e fagocitose (ADCP). A variante G236R/L328R, também conhecida por Fc-nocaut ou Fc-KO, falta de ligação ao receptor de Fcs, e é usado como um controle nos experimentos aqui descritos

Variantes selecionadas foram construídas em anticorpos que alvejam de IgE. As regiões variáveis de cadeia leve e pesada (VH e VL) de anticorpos anti-IgE estão dispostas na Figura 5. Omalizumab é um anticorpo humanizado que está atualmente aprovado para o tratamento da asma alérgica, e é comercializado sob o nome Xolair. MaE11 é o precursor murino de Omalizumab. H1L1_MaE11 é uma versão humanizada nova de MaE11. Genes codificando os domínios de VH e VL pesado e leve destes anticorpos anti-IgE foram sintetizados comercialmente (Blue Heron Biotechnologies). A região variável de genes VH e VL também foi sintetizada do anticorpo para anti-vírus respiratório sincicial (VRS) motavizumab, utilizados nos experimentos aqui descritos como controle negativo. Genes VL foram subclonados no vetor de expressão de mamíferos pTT5 (NRC-BRI, Canadá) codificando a cadeia

constante Ckappa. Genes VH foram subclonados de vetores pTT5 para a codificação de cadeias nativa IgG1 variantes e constantes. Sequências de aminoácido das cadeias constantes selecionadas são fornecidas na Figura 6. Todo o DNA foi sequenciado de confirmar a fidelidade das sequências. As sequências de aminoácido do comprimento total de cadeias pesadas e leves de anticorpos selecionados são fornecidas na Figura 7.

Plasmídios de cadeia pesada e leve contendo genes foram co-transfectado em células HEK293E usando Lipofectamine (Invitrogen) e cultivadas em meio 293 FreeStyle (Invitrogen). Após 5 dias de crescimento, os anticorpos foram purificados a partir da cultura sobrenadante por afinidade de proteína A utilizando resina MabSelect (GE Healthcare).

IgG1 anti-IgE variante e nativas foram testados para a ligação de IgE e FcγRIIb usando Biacore. DNA de codificação da região Fc de IgE que contém a local de ligação para a anticorpos anti-de IgE utilizado, foi sintetizada (Blue Heron Biotechnologies) e subclonado no vetor pTT5. Fc de IgE foi expressa em células 293E e purificado utilizando proteína A, como descrito acima. Medições SPR foram realizadas utilizando a proteína A/ método de captura de anticorpo descrito acima, exceto que o analito era FcγRIIb ou a região Fc de IgE. Ajuste dos dados e aquisição são como descritos acima. Figura 8 fornece resultados de ligação de equilíbrio constante (KDS) obtidos a partir dessas experiências obrigatórias, bem como a afinidade vezes em relação aos IgG1 nativas para a ligação de FcγRIIb. A Figura 9 mostra parcelas destes dados. Os resultados confirmam a alta dos Anticorpos afinidade para IgE, e que a variante S267E/L328F melhora a ligação de FcγRIIb mais duas ordens de grandeza, de acordo com resultados anteriores.

O uso de variantes específicas, por exemplo S267E/L328F e S239D/I332E, destinam-se aqui como prova de conceito para a mecanismo descrito neste documento, e não são destinados a restringir a invenção ao seu uso particular. Os dados fornecidos USSN 12/156, 183 e USSN 11/124, 620 indicam que um número de variantes de engenharia, em posições específicas Fc, fornece as propriedades específicas. Substituições para melhorar a afinidade FcγR, especialmente para FcγRIIb, inclui: 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328, e 332. Em algumas modalidades, substituições são feitas para, ao menos, uma ou mais das seguintes posições não limitante para aumentar a afinidade de FcγRIIb: 235, 236, 239, 266, 267, 268, e 328.

Combinações não limitantes de posições para fazer substituições para aumentar a afinidade de FcγRIIb inclui: 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, e 328/332. Em algumas modalidades, combinações de posições para fazer substituições para

5 aumentar a afinidade de Fc γ R11b inclui, mas não estão limitadas a: 235/267, 236/267, 239/268, 239/267, 267/268, e 267/328.

Substituições para aumentar a afinidade de Fc γ R11b inclui: 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, e 332E. Em algumas

10 modalidades, combinações de posições para fazer substituições para aumentar a afinidade de Fc γ R11b inclui, mas não estão limitadas a: 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W, e 328Y.

Combinações de substituições para aumentar a afinidade de Fc γ R11b inclui:

15 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,

20 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,

25 L328F/I332E, L328W/I332E, e L328Y/I332E. Em algumas modalidades, combinações de substituições para aumentar a afinidade de Fc γ R11b inclui, mas não estão limitadas a: L235Y/S267E, G236D/S267E, S239D/H268D, S239D/S267E, S267E/H268D, S267E/H268E, e S267E/L328F.

Exemplo 3. Inibição *In vitro* de células IgE+ B por anticorpos anti-IgE com alta

30 afinidade de Fc γ R11b

Um ensaio imunoenzimático (ELISA) foi criado para detectar IgE. Placas de fundo plano foram preparados por revestimento com tampão NaBicarbonato pH 9,4, seguido por aderência com anti-IgE, anticorpos de captura de 10 ug/ml durante a noite em pH 9,4 (tampão 0,1 M NaBicarbonato). Depois de uma noite, a placa foi

35 bloqueada com 3% BSA/PBS, diluições e de série de IgE (de um kit ELISA IgE humano, Bethyl Laboratories) foi adicionado 3x de 1 ug/ml. Após três horas, as

placas foram lavadas 3x (200 ul) com TTBS, IgE e ligada foi medido. HRP- anticorpo conjugado caprino anti-humano policlonal de IgE (Bethyl Laboratories) foi adicionado em (1:5000) por 1 hora em 1% BSA / PBS. As amostras foram lavadas 3x e IgE foi detectado com TMB substrato peroxidase (KPL, Inc 50-76-00). As reações foram interrompidas com 50ul 2N H₂SO₄ e ler a 450 nm

A Figura 10 mostra a captura de IgE com vários anticorpos anti-humano de IgE, incluindo um pool de três anticorpos monoclonais anti-IgE (MabTech; 107/182/101), e MaE11_IgG1_G236R/L328R Omalizumab_IgG1_G236R/L328R. Os dados mostram que o reagente comercial anticorpo anti-IgE (MabTech), Omalizumab, e seu anticorpo principal quimérico MaE11 são capazes de capturar IgE. Com vista a utilização deste exame para detectar IgE, foi necessário determinar se os anticorpos MaE11 omalizumab electrónico iria interferir com a IgE a captura com o reagente MabTech anti-IgE. O ensaio foi repetido conforme descrito acima, a concentração de IgE e de absorbância foi calculada usando uma curva padrão. Figura 11 mostra que o anticorpo anti-IgE omalizumab_G236R/L328R não competindo com a anticorpo anti-IgE MabTech no protocolo de ELISA atual.

Anticorpos anti variante Fc IgE foram testados quanto à capacidade de inibir as células IgE B +. Humano PBMCs foram induzidos para mudança de classe para células produtoras de IgE B pela adição de 5 ng/ ml a interleucina-4 (IL-4) e 100 ng / anticorpo anti-CD40 ml (G28.5 clone IgG1). O anticorpo anti-CD40 é um agonista de CD40, e, portanto, imita a atividade a CD40L co-ativador. Variando a concentração de anticorpos anti-IgE foram adicionadas, e as amostras foram incubadas por 12 dias. Placas de ELISA foram preparadas e bloqueadas como descrito acima, com 5 ug / ml Mabtech anti-IgE como a anticorpo de captura. E 100 ul de amostras de PBMC foram adicionados incubadas > 3 horas, e depois lavados com 3x TTBS (200 ul). Anticorpo-HRP conjugado anticorpo foi acrescentado e detectadas como descrito acima. Absorvância a 450 nm foi convertido para IgE concentração, utilizando uma curva padrão. Os resultados são mostrados na Figura 12.

Anticorpos sem ligação FcγR (variantes G236R/L328R) não tendo especificidade para IgE (anticorpo anti-RSV Motavizumab) não teve efeito sobre a produção de IgE a partir de células diferenciadas B. Em contraste, os anticorpos variantes com maior afinidade para FcγRIIb inibiu a produção de IgE. Estes dados sugerem que a co-participação da superfície IgE e do receptor inibitório FcγR inibe a classe de comutação FcγRIIb de células B desse tipo de imunoglobulina. Inibição das células IgE + B reduz a número de células expressando IgE do plasma, que por sua vez, reduz a quantidade de IgE detectado. Para avaliar a seletividade dessa

atividade para a produção IgE células B, IgG2 humana foi medido a partir a mesma amostra usando um teste ELISA IgG2 (Bethyl Laboratories). A Figura 13 mostra que a secreção de IgG2 não foi inibida, indicando que a atividade inibitória de anticorpos anti-IgE com alta afinidade de Fc γ R1Ib é seletivo para células de classe de comutação IgE. Repita deste experimento usando versões variante a aprovado anticorpo anti-IgE Omalizumab mostrou resultados semelhantes inibitória pela variante com alta afinidade de Fc γ R1Ib (Figura 14).

A capacidade de anticorpos anti-IgE de alta afinidade Fc γ R1Ib para inibir a produção IgE foi avaliada na presença de estimulação mIgE BCR. O teste acima foi repetido, com a mudança para classe IgE promovido pela IL-4 e α -anticorpo CD40 agonista, e além disso as células B foram ativadas usando anti-mu ou anticorpo anti-CD79b. Estes anticorpos de ligação cruzada com BCR, proporcionando assim um sinal semelhante para antígeno imune-complexos. Anticorpo anti-mu ligações cruzadas membrana ancoradas IgM e anti-CD79b ligações cruzadas CD79b, que é um componente de sinalização do complexo BCR. PBMCs foram incubados por 14 dias com IL-4, α -CD40, e nem anti-CD79b OU anti-mu, IgE e foi detectado como descrito acima. Os resultados para o anti-CD79b (figura 15) e anti-mu (Figura 16) mostram que a anticorpos anti-IgE de alta afinidade para Fc γ R1Ib são capazes de inibir a produção de IgE, quando as células B são estimuladas através de ligação cruzada BCR.

Uma estratégia adicional para inibir células IgE + B é esgotá-lo. Isto pode ser efetuado através de um anticorpo anti-IgE, que é melhorada pela função efetora. A variante de ligação S239D/I332E aumenta para ativação do receptor Fc γ R1IIa e Fc γ R1IIIa (Figura 3 e Figura 4), e, portanto, melhora funções efetoras ADCC e ADCP. O ensaio de célula B acima foi realizado utilizando uma variante S239D/I332E dos anticorpos anti-IgE Omalizumab. PBMCs foram incubados por 14 dias com IL-4, α -CD40, e nem anti-CD79b (figura 17) ou anti-mu (figura 18), e IgE foi detectado como descrito acima. Os resultados (Figuras 17 e 18) mostram que os anticorpos anti-IgE com função efetora otimizada são capazes de inibir a produção de IgE da classe de comutação de células IgE + B

Exemplo 4. Inibição *In vivo* de células IgE+ B por anticorpos anti-IgE com alta afinidade para Fc γ R1Ib

As imunoglobulinas divulgadas no presente documento foram avaliadas através de um modelo do rato huPBL-SCID como um substituto para a atividade terapêutica em seres humanos. Este estudo examinou a capacidade de anticorpos anti-IgE aqui descritos para inibir a atividade das células B e de desenvolvimento

das células de plasma em resposta a um alérgeno humano comum - proteína de ácaros de poeira Der p 1. Neste método, os leucócitos do sangue periférico humano (PBLs) de um doador de sangue com a resposta alérgica para Der p 1, foram enxertados para camundongos imuno-deficientes e SCID tratados com os anticorpos ou variante nativa de anti-IgE. Os camundongos foram desafiados com antígeno para estimular uma resposta imune, produção de imunoglobulinas e foi medido para analisar o curso de desenvolvimento de células B em células plasmáticas.

Os doadores de sangue foram selecionados para alergia para antígenos de ácaros com base na presença de anticorpos anti-IgE contra a Der p 1. Um doador com reatividade positiva foi obtido leucaferesado para células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O protocolo para o estudo é fornecido na Figura 20. Um dia antes da injeção de células mononucleares, os camundongos receberam por via intraperitoneal (ip) com 100 ul injeções de anti-anticorpo asialo GM (Wako, Richmond, VA) para esgotar células murino natural killer (NK). No dia seguinte, os ratos foram injetados com (i.p.) 3×10^7 PBLs em um volume de 0,5 ml. Após a injeção de células mononucleares, os ratos foram divididos em 5 grupos diferentes de camundongos com 7 ratos em cada grupo. No 7º dia pós-injeção de células mononucleares, foi colhido sangue de todos os ratos através do seio retro-orbital / plexo (OSP), punção para a determinação de IgG humana e os níveis IgE por ELISA (ZeptoMetrix, Buffalo, NY). Dois dias depois (dia 9), os ratos foram injetados i.p. com 10 mg/kg anticorpo ou PBS. No dia 11, os ratos foram injetados i.p. com 15 ug de antígeno de ácaros de poeira Der p 1 (LoTox Natural Der p 1, Indoor Biotechnologies, Charlottesville, VA). No 23º dia (12 dias após a vacinação antígeno), foi colhido sangue de todos os ratos para determinação de IgG humana e anticorpos IgE. No mesmo dia, os camundongos receberam uma segunda injeção ip com 10 mg / kg anticorpo OU PBS. Dois dias depois (dia 25), os camundongos receberam um reforço de vacinação ip de 10 ug de antígeno ácaro de poeira Der p 1. No 37º dia (12 dias após reforço de antígeno), foi colhido sangue pela OPS para a determinação de imunoglobulina humana. Humanos concentrações de IgG e IgE foram medidos por métodos ELISA semelhantes aos descritos acima.

Os resultados são mostrados nas Figuras 20 e 21 para níveis de soro IgG e IgE, respectivamente. Antes de desafio antigênico, os níveis de IgG humana e anticorpos IgE foram baixos em todos os grupos. Após a imunização Der p 1, todos os grupos apresentaram elevados níveis de IgG humana, indicando uma resposta imunológica robusta por células B enxertadas, tanto para antígenos Der p 1

vacinados quanto para antígeno de camundongo endógenos. Em contraste com a resposta de IgG, os grupos de tratamento diferiram significativamente na sua produção de anticorpos IgE. Omalizumab e versão IgG1 de H1L1 MaE11 foram equivalentes ao veículo em sua capacidade para inibir a produção de IgE humana.

5 No entanto, a versão Fc γ RIIb melhorada (IIbE, S267E/L328F) de H1L1 MaE11 não apresentou níveis detectáveis de IgE humana. A versão FC-KO (variante G236R/L328R) do H1L1 MaE11, que não tem caráter vinculativo para todas Fc γ Rs, mostrando um aumento na produção de IgE humana.

Isto é possivelmente devido à sua capacidade de mIgE humano com ligação
10 cruzada e assim ativar células IgE + B, mas a sua completa falta de Fc γ RIIb inibitória ou atividades citotóxicas Fc γ RIIIa/IIIa, tais como aqueles possuídos pelas versões IIbE e IgG1 do anticorpo. Estes dados *in vivo* mostram que os anticorpos anti-IgE com alta afinidade para Fc γ RIIb são capazes de inibir ativação de células IgE +B humana e diferenciação de plasma das células secretoras de
15 imunoglobulina, e assim contribuir para o potencial das imunoglobulinas divulgadas no presente documento para tratar desordens mediadas por IgE

Todas as referências citadas são aqui expressamente incorporadas por referência em sua totalidade.

Considerando modalidades específicas que foram descritas acima para fins
20 de ilustração, será apreciado por aqueles versados na técnica que inúmeras variações de detalhes podem ser feitas sem se afastar da invenção conforme descrito nas reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo, **caracterizado** pelo fato de que compreende:
 - a) uma cadeia pesada compreendendo:
 - i) região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:17; e
 - ii) um domínio Fc variante de um polipeptídeo Fc de IgG original de humano; e
 - b) uma cadeia leve compreendendo uma região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:21, em que o referido domínio Fc variante compreende substituições de aminoácido 267E e 328F; e em que a numeração é de acordo com o índice EU de Kabat.
2. Anticorpo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o referido domínio Fc variante é um domínio Fc de IgG1 humano variável.
3. Anticorpo, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que possui SEQ ID NO:42 e uma cadeia leve que possui SEQ ID NO:40.

Figura 1

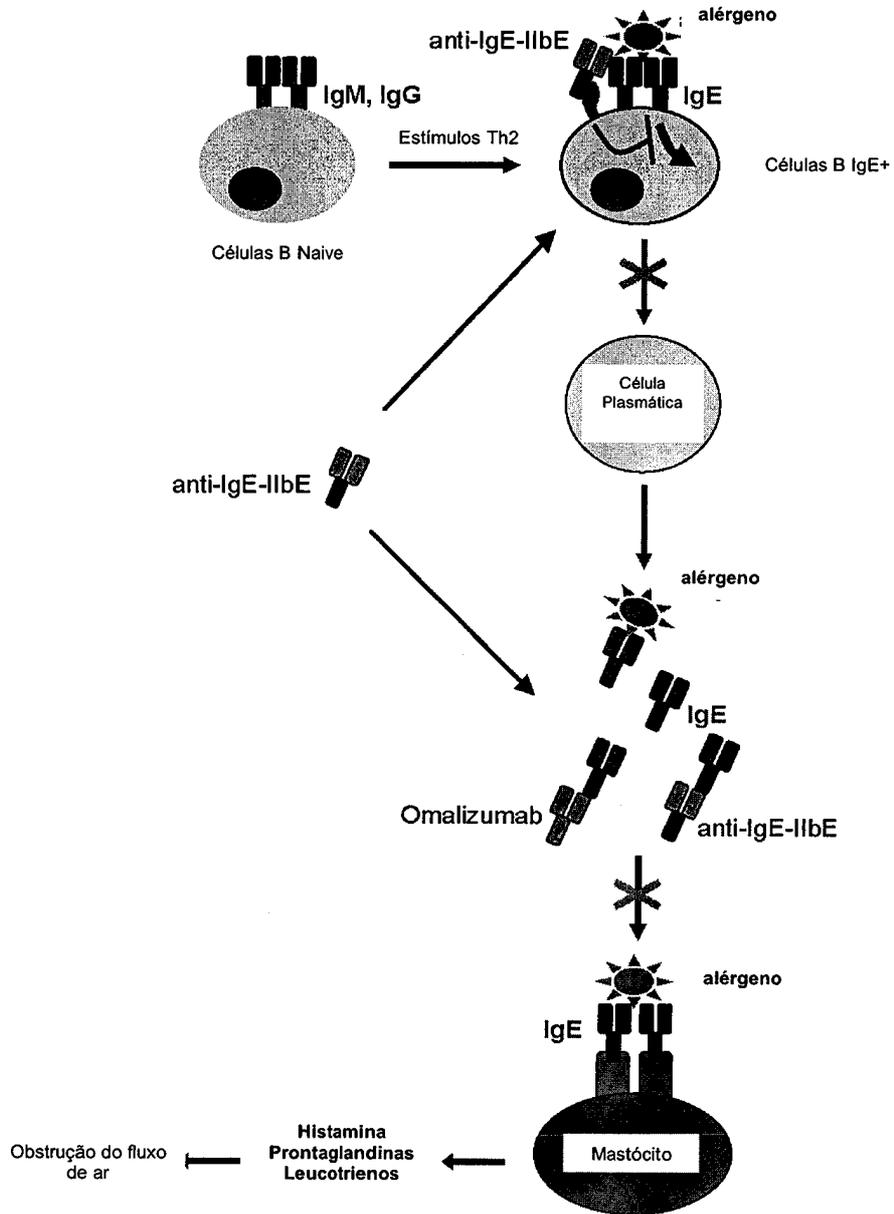


Figura 2

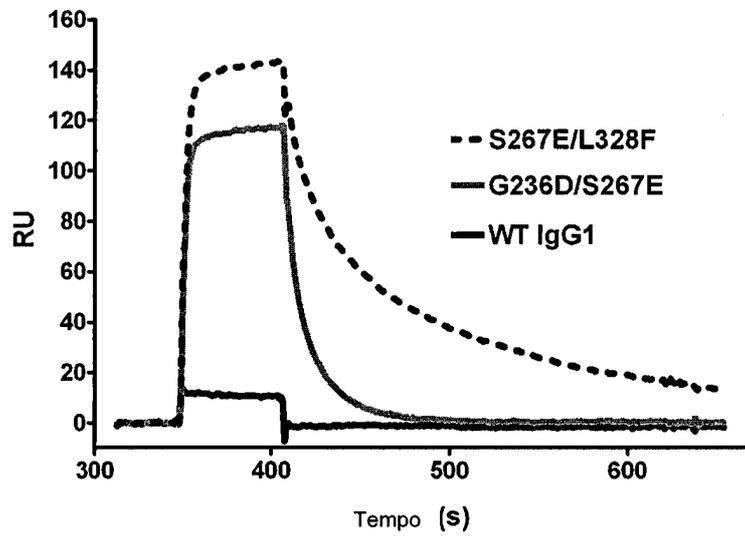


Figura 3

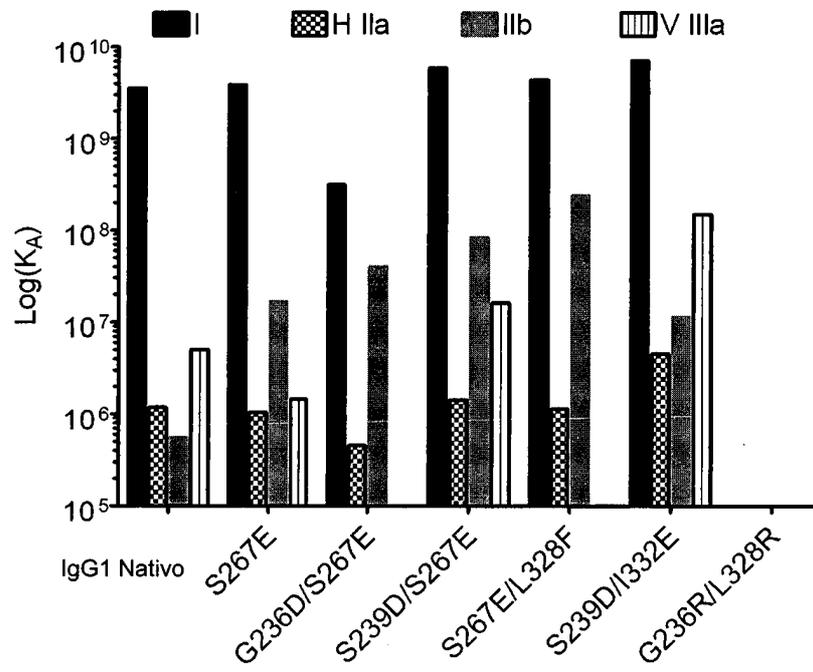


Figura 4

Anticorpo	FcγRI		H131 FcγRIIa		FcγRIIb		V158 FcγRIIIa	
	KD (M)	Vezes	KD (M)	Vezes	KD (M)	Vezes	KD (M)	Vezes
IgG1 Nativo	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 5Omalizumab VH (SEQ ID N°: 1)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAIVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNYNPSV
KGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGTLTVSS

Omalizumab VH CDR1 (SEQ ID N°: 2)

YSITSGYSW

Omalizumab VH CDR2 (SEQ ID N°: 3)

TYDGS

Omalizumab VH CDR3 (SEQ ID N°: 4)

GSHYFGHWHFAV

Omalizumab VL (SEQ ID N°: 5)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLESGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Omalizumab VL CDR1 (SEQ ID N°: 6)

QSVSDYDGDSY

Omalizumab VL CDR2 (SEQ ID N°: 7)

AASYLES

Omalizumab VL CDR3 (SEQ ID N°: 8)

SHEDPYT

MaE11 VH (SEQ ID N°: 9)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLACSVTGYSITSGYSWNWIRQFPGNKLEWMGSITYDGSSNYNPSL
KNRISVTRDTSQNQFFLKLNSATAEDTATYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTTVTVSS

MaE11 VH CDR1 (SEQ ID N°: 10)

YSITSGYSW

MaE11 VH CDR2 (SEQ ID N°: 11)

TYDGS

MaE11 VH CDR3 (SEQ ID N°: 12)

GSHYFGHWHFAV

MaE11 VL (SEQ ID N°: 13)

DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVSDYDGDSYMNWYQQKPGQPILLIYAASYLGSEIPARF
SGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATFYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIK

MaE11 VL CDR1 (SEQ ID N°: 14)

QSVSDYDGDSY

MaE11 VL CDR2 (SEQ ID N°: 15)

AASYLGS

Figura 5 (continuação)MaE11 VL CDR3 (SEQ ID N°: 16)

SHEDPYT

H1L1MaE11 VH (SEQ ID N°: 17)QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVAVSGYSITSGYSWNVIRQPPGKKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTISRDTSKN
QFSLKLSSTAADTAVYYCARGSHYFGHWHFVAVWGAGTLVTVSSH1L1 MaE11 VH CDR1 (SEQ ID N°: 18)

YSITSGYSW

H1L1 MaE11 VH CDR2 (SEQ ID N°: 19)

TYDGS

H1L1 MaE11 VH CDR3 (SEQ ID N°: 20)

GSHYFGHWHFVAV

H1L1 MaE11 VL (SEQ ID N°: 21)DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSVVDYDGDSYMNVWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSEIPARF
SGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKH1L1 MaE11 VL CDR1 (SEQ ID N°: 22)

QSVVDYDGDY

H1L1 MaE11 VL CDR2 (SEQ ID N°: 23)

AASYLGS

H1L1 MaE11 VL CDR3 (SEQ ID N°: 24)

SHEDPYT

TES-C21 VH (SEQ ID N°: 25)QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKTTGYTFSMYWLEWVKQRPVGHGLEWVGEISPGTFTTNYNEKF
KAKATFTADTSSNTAYLQLSGLTSEDSAVYFCARFSHFSGSNYDYFDYWGQGTSLTVSSTES-C21 VH CDR1 (SEQ ID N°: 26)

YTFSMYW

TES-C21 VH CDR2 (SEQ ID N°: 27)

SPGTFT

TES-C21 VH CDR3 (SEQ ID N°: 28)

FSHFSGSNYDYFDY

TES-C21 VL (SEQ ID N°: 29)DILLTQSPAILSVPGERVFSFSCRASQSIGTNIHWYQQRDGGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG
TEFTLNINSVESEDIADYCYCQQSDSWPTTFGGGTKLEIKTES-C21 VL CDR1 (SEQ ID N°: 30)

QSIGTN

Figura 5 (continuação)

TES-C21 VL CDR2 (SEQ ID N°: 31)

YASESIS

TES-C21 VL CDR3 (SEQ ID N°: 32)

SDSWPTT

Figura 6Ckappa cadeia leve (SEQ ID N°: 33)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG1 Nativo cadeia constante (SEQ ID N°: 34)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

S267E/L328F IgG1 cadeia constante (SEQ ID N°: 35)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

G236D/S267E IgG1 cadeia constante (SEQ ID N°: 36)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLDGPVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK

Figura 7Omalizumab cadeia leve (VH-C_κ) (SEQ ID N°: 37)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAASYLESQVPSR
 FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKLS
 GTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Omalizumab IgG1 cadeia pesada (SEQ ID N°: 38)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKLEWVASITYDGSTNYNPSV
 KGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Omalizumab S267E/L328F cadeia pesada (SEQ ID N°: 39)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKLEWVASITYDGSTNYNPSV
 KGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWFAVWGQGLVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H1L1 MaE11 cadeia leve (VH-C_κ) (SEQ ID N°: 40)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDYDGDSYMNWYQQKPGQPPKLLIYAASYLGSEIPARF
 SSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
 ASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC
 EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

H1L1 MaE11 IgG1 cadeia pesada (SEQ ID N°: 41)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTISRDTSKN
 QFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHMFAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

H1L1 MaE11 S267E/L328F cadeia pesada (SEQ ID N°: 42)

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPGKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTISRDTSKN
 QFSLKLSVTAADTAVYYCARGSHYFGHMFAVWGAGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK
 VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVEHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 8

Anticorpo	IgE KD (M)	FcγRIIb KD (M)	FcγRIIb Veze
Omalizumab_IgG1_WT	2.2E-10	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

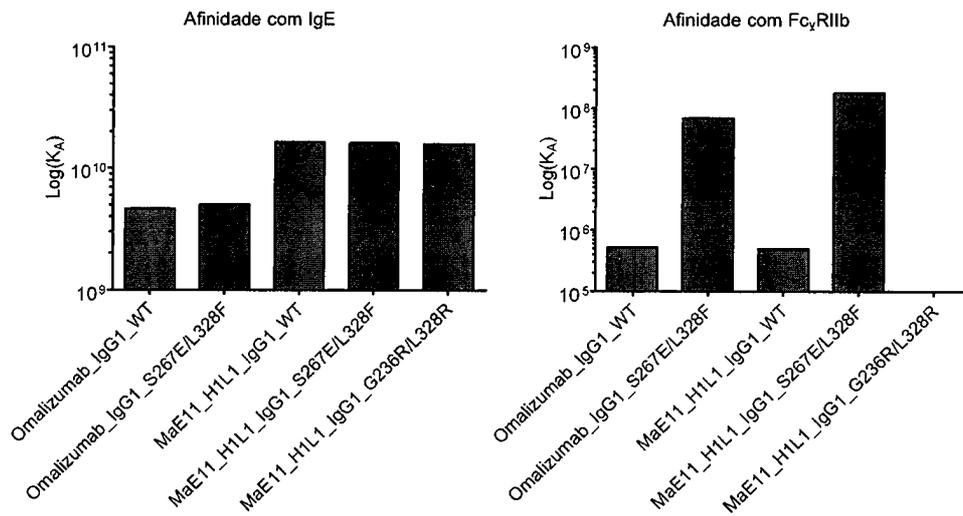


Figura 10

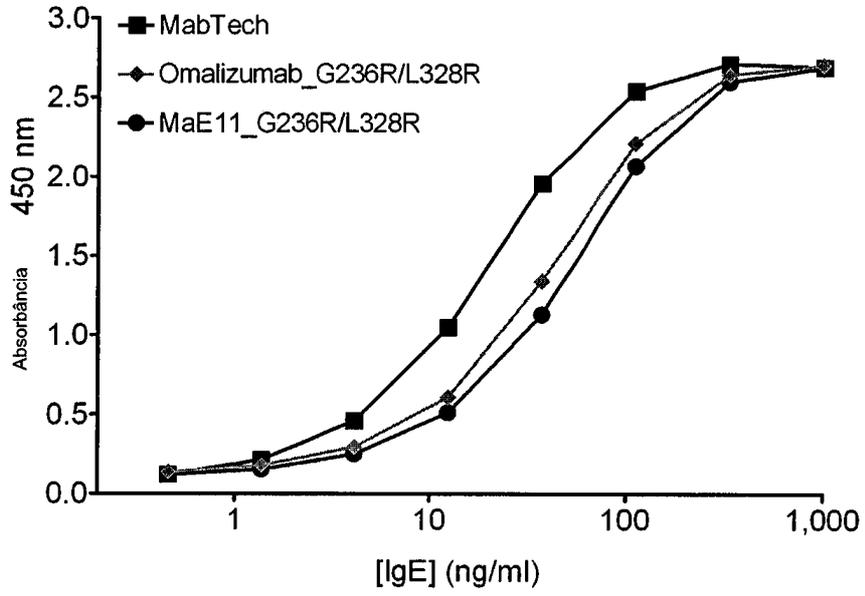


Figura 11

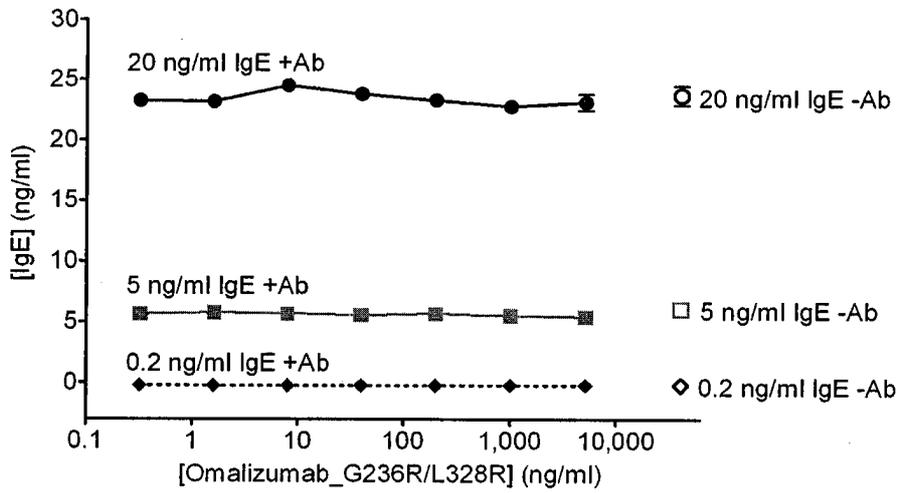


Figura 12

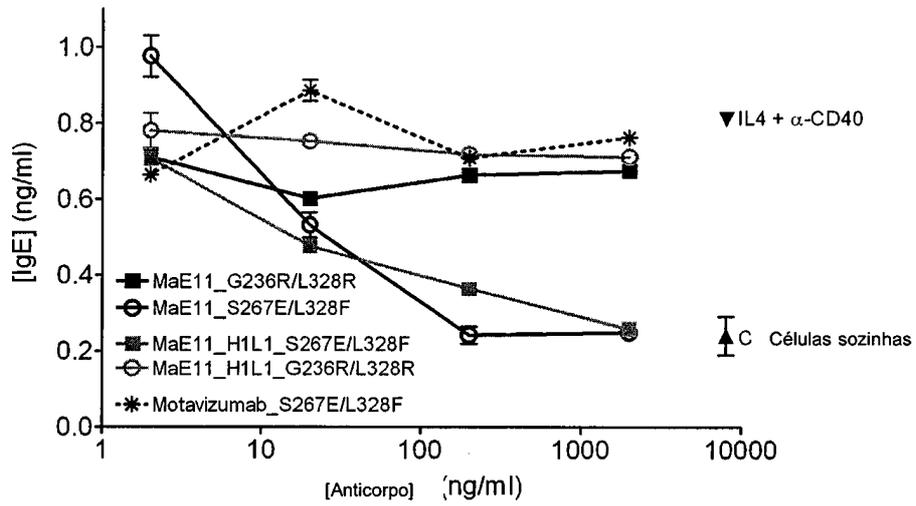


Figura 13

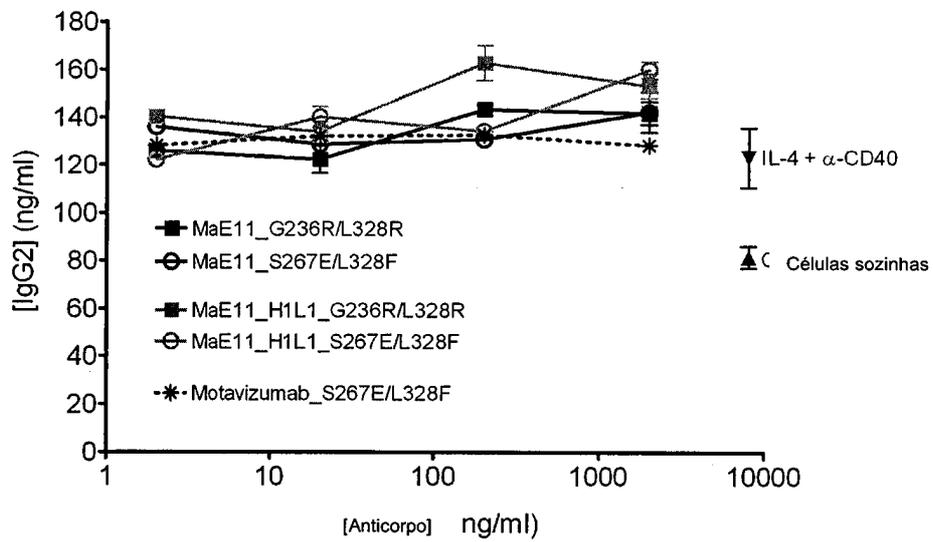


Figura 14

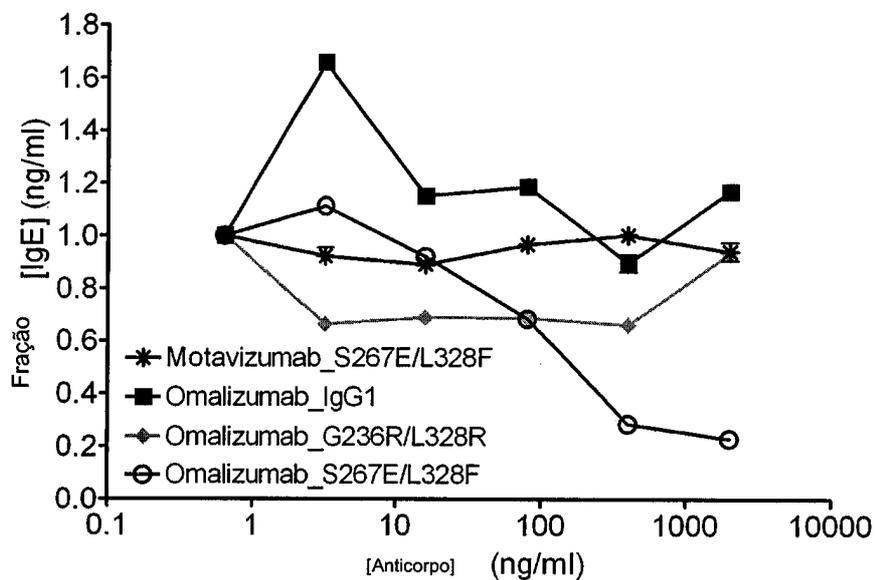


Figura 15

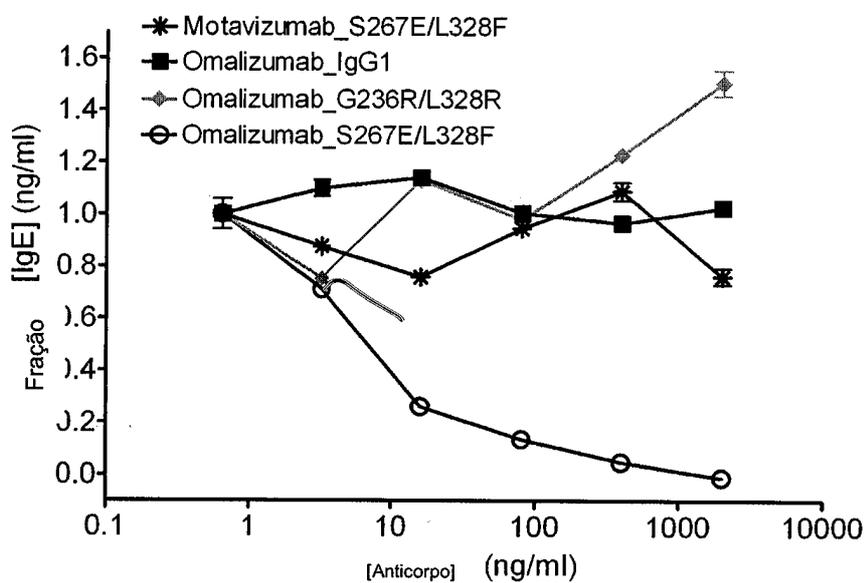


Figura 16

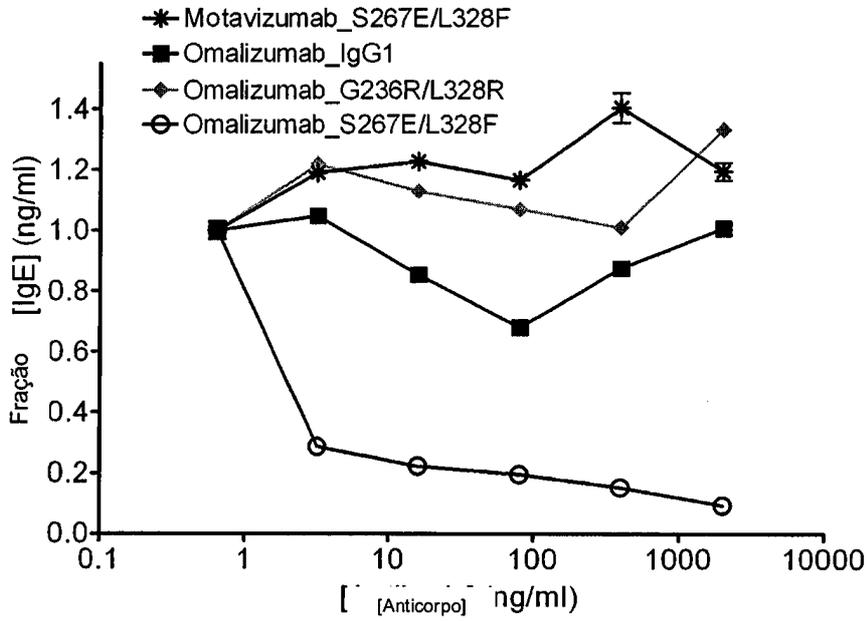


Figura 17

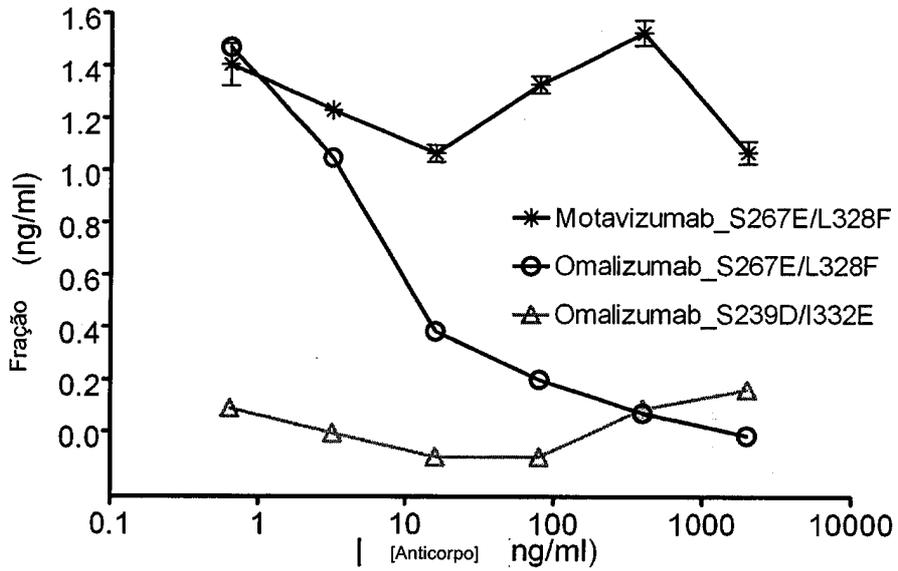


Figura 18

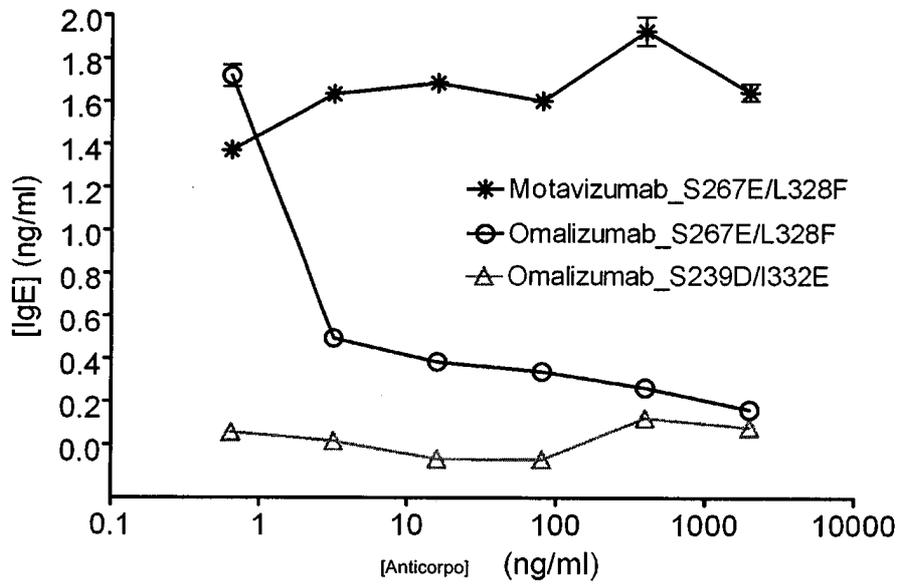


Figura 19

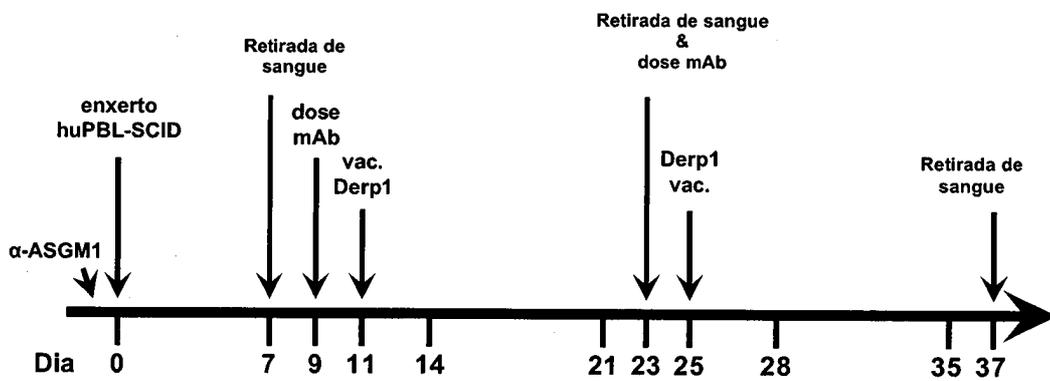


Figura 20

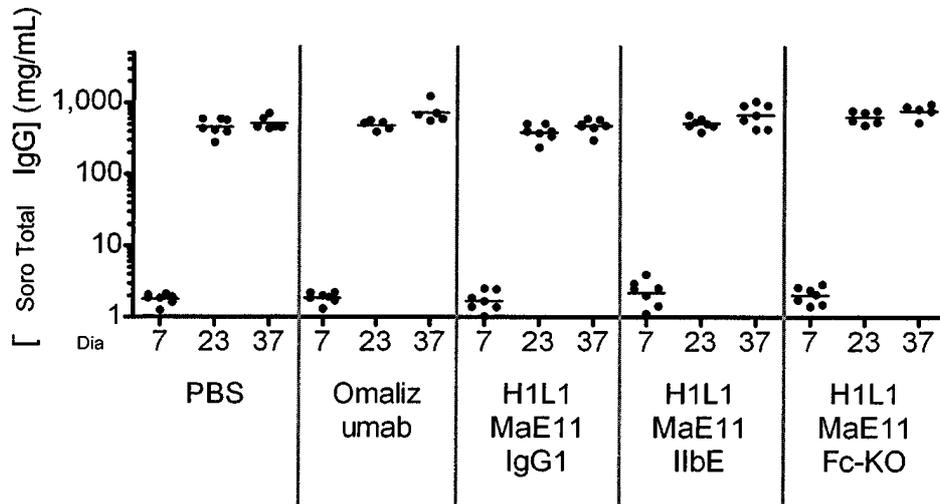


Figura 21

