ANTICUERPOS AGONISTAS CONTRA CD200R Y SUS USOS

La presente invención se encuentra en el campo de la medicina. Con mayor particularidad, la presente invención se refiere a anticuerpos agonistas dirigidos al receptor CD200 (CD200R), composiciones que comprenden tales anticuerpos agonistas de CD200R, y métodos para usar tales anticuerpos agonistas de CD200R para el tratamiento de trastornos tales como enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, asma, u otros trastornos inflamatorios.

Las vías del punto de control inmunitario pueden modular tanto la respuesta autoinmunitaria como la respuesta inmunitaria anticancerígena. En el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, se desea promover, es decir, agonizar, el efecto de una vía inmunosupresora, de manera tal que se suprima la respuesta inmunitaria. Por el contrario, en el tratamiento contra el cáncer, se desea inhibir, es decir, antagonizar, el efecto de una vía inmunoinhibidora, de manera tal que la respuesta inmunitaria se desreprima (estimule).

CD200R es un miembro de la superfamilia de Ig y parte de una familia de receptores de puntos de control que regulan negativamente la activación de las células inmunitarias. La activación de la vía CD200R conduce a una disminución de la función celular, como la reducción de la proliferación celular y la inhibición de las citocinas inflamatorias. CD200R se expresa principalmente en la superficie de las células del sistema innato, específicamente del linaje monocítico como los macrófagos, los mastocitos, las células dendríticas, pero también en subconjuntos de linfocitos T activados, como los linfocitos T de memoria. El ligando natural para CD200R es CD200, que se expresa más ampliamente en múltiples tipos de células, incluidos los linfocitos. Los ratones *knockout* CD200R y CD200 tienen un fenotipo normal, pero son más propensos a la enfermedad autoinmunitaria inducida (véase, por ejemplo, Simelyte *et al*., Clin Exp Immunol. 162: 163-8 (2010)). Por el contrario, la sobreexpresión de CD200 en ratones proporciona resistencia al trasplante alogénico y a la colitis inducida por DSS (Chen *et al.*, PLoS One. 2016; 11 (2): e0146681. doi: 10.1371/journal.pone.0146681).

Por lo tanto, aumentar la señalización mediada por CD200R constituye un enfoque potencial para manejar los trastornos autoinmunitarios que pueden conducir a una modificación profunda de la enfermedad y la durabilidad de la respuesta junto con beneficios clave de seguridad sobre los tratamientos inmunomoduladores actuales.

Por ejemplo, CD200R se expresa altamente en células diferenciadas residentes en tejidos como macrófagos, mastocitos, células dendríticas y células linfoides innatas. Estos tipos de células contribuyen a la patología de enfermedades como la dermatitis atópica y, por lo tanto, los anticuerpos agonistas de CD200R pueden atenuar la actividad de estas células en enfermedades como la dermatitis atópica.

El campo se ha esforzado por suministrar anticuerpos agonistas contra CD200R terapéuticamente efectivos y seguros. Se cree que la dificultad, al menos en parte, es el resultado de las complejas interacciones celulares requeridas para lograr el agonismo de CD200R con inquietudes mínimas de seguridad (por ejemplo, sin inducir la liberación de citocinas) en entornos fisiológicos.

La patente estadounidense 8.212.008 describe anticuerpos contra CD200R, tales como Dx182. Dx182 es un anticuerpo IgG1 humanizado que agoniza CD200R y bloquea la fijación de CD200 a CD200R. Sin embargo, Dx182 también se fija y activa el CD200RLa de macaca fascicularis (forma de activación de mono macaca fascicularis) expresado en los mastocitos murinos, y por lo tanto induce una respuesta de desgranulación de los mastocitos en estas células a través del CD200RLa de macaca fascicularis. El documento WO 2015/057906 también describe anticuerpos agonistas contra CD200R, tales como H2RM147. Es probable que H2RM147 compita con el CD200 humano para fijarse al CD200R1 humano.

Por lo tanto, existe la necesidad de anticuerpos contra CD200R alternativos que 1) se fijen a CD200R humano con tasas de asociación y disociación deseables para una actividad agonista óptima, 2) agonicen el CD200R humano para lograr una respuesta inmunosupresora y eficacia *in vivo*, 3) muestren potencia suficiente como monoterapia para el tratamiento y/o prevención de trastornos tales como trastornos autoinmunitarios, enfermedades alérgicas, asma u otros trastornos inflamatorios, 4) no causen una liberación significativa de citocinas, 5) no bloqueen la fijación de CD200 humano y CD200R humano, 6) no se fijen a CD200RLa o se fijen a CD200RLa con baja afinidad, y/o 7) demuestren baja inmunogenicidad (es decir, que sean suficientemente no inmunogénicos en macaca fascicularis y/o humanos) y estabilidad *in vivo*, estabilidad física y química que incluyen, entre otros, estabilidad térmica, solubilidad, baja autoasociación y características farmacocinéticas que son aceptables para el desarrollo y/o uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, enfermedades alérgicas, asma u otros trastornos inflamatorios.

Por consiguiente, la presente invención proporciona nuevos anticuerpos agonistas contra CD200R antihumano. Los anticuerpos de la presente invención son

particularmente ventajosos sobre los anticuerpos agonistas contra CD200R del estado de la técnica en vista de al menos las siguientes propiedades: 1) tasas deseables de asociación y disociación, 2) agonismo de CD200R humano para lograr una respuesta inmunosupresora y eficacia *in vivo*, 3) suficientemente potente como monoterapia para el tratamiento y/o prevención de trastornos autoinmunitarios, enfermedades alérgicas, asma u otros trastornos inflamatorios, 4) sin liberación significativa de citocinas, 5) sin bloqueo de la fijación de CD200 humano al CD200R humano, y la fijación a un epítopo diferente en comparación con los anticuerpos del estado de la técnica, 6) falta de fijación, o fijación con baja afinidad, de CD200RLa de *cyno* en comparación con la fijación al CD200R humano, y/o 7) baja inmunogenicidad (es decir, que sean suficientemente no inmunogénicos en macaca fascicularis y/o humanos) y estabilidad *in vivo*, estabilidad física y química que incluye, entre otros, estabilidad térmica, solubilidad, baja autoasociación y características farmacocinéticas que son aceptables para el desarrollo y/o uso en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, enfermedades alérgicas, asma u otros trastornos inflamatorios.

La presente invención proporciona un avance sobre el estado de la técnica al proporcionar composiciones y métodos útiles en la prevención, regulación descendente o mejora de los trastornos relacionados con la tolerancia autoinmunitaria y/o inmunitaria, enfermedades alérgicas, asma u otros trastornos inflamatorios, a través de la estimulación del punto de control inmunitario mediante un anticuerpo agonista contra CD200R antihumano modificado por ingeniería genética de manera significativa. Los anticuerpos agonistas contra CD200R antihumanos de la presente invención son capaces de mejorar la patología inmunitaria o restaurar la homeostasis inmunitaria, preferentemente, mediante la inhibición del brazo innato de la respuesta inmunitaria, la anulación del proceso inmunitario específico del antígeno y, por lo tanto, abordar directamente la patología subyacente de la enfermedad. El uso de tales anticuerpos de manera clínica puede conducir a una durabilidad a largo plazo de las enfermedades que se están tratando.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija al CD200R humano (SEQ ID NO: 15), que comprende una región variable de la cadena pesada (HCVR) y una región variable de la cadena liviana (LCVR), en donde la HCVR comprende HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la LCVR comprende LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 está dada por SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 está dada por SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 está dada por SEQ ID NO: 3, la secuencia de

aminoácidos de la LCDR1 está dada por SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 está dada por SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 está dada por SEQ ID NO: 6.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija al CD200R humano, que comprende una HCVR y una LCVR, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR está dada por SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR está dada por SEQ ID NO: 8. En algunas formas de realización, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 7 es glutamina. En otras formas de realización, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 7 es ácido piroglutámico.

En una forma de realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se fija al CD200R humano, que comprende una cadena pesada (HC) y una cadena liviana (LC), en donde la secuencia de aminoácidos de la HC está dada por SEC ID NO: 9 y la secuencia de aminoácido de la LC está dada por SEQ ID NO: 10. En algunas formas de realización, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es glutamina. En otras formas de realización, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es ácido piroglutámico. En algunas formas de realización, Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 es glicina. En algunas formas de realización, Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 está ausente. En una forma de realización particular, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es glutamina y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 es glicina. En otra forma de realización particular, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es ácido piroglutámico y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 es glicina. En una forma de realización particular, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es glutamina y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 está ausente. En otra forma de realización particular, Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es ácido piroglutámico y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 está ausente.

En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención no provoca una liberación significativa de citocinas. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En una forma de realización preferida, el anticuerpo no provoca una liberación significativa de citocinas y el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En algunas de tales formas de realización, el anticuerpo es un subtipo de IgG4, preferentemente, un IgG4P. En otra forma de realización, el anticuerpo se fija al CD200R humano y al mono macaca fascicularis.

La presente divulgación también proporciona una célula de mamífero capaz de expresar un anticuerpo de CD200R antihumano que comprende: 1) una HCVR que

comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y 2) una LCVR que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona una célula de mamífero capaz de expresar un anticuerpo contra CD200R antihumano que comprende: 1) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y 2) una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona una célula de mamífero capaz de expresar un anticuerpo contra CD200R que comprende: 1) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y 2) una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona que el anticuerpo contra CD200R consiste en dos cadenas pesadas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y dos cadenas livianas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención no provoca una liberación significativa de citocinas. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En una forma de realización preferida, el anticuerpo no provoca una liberación significativa de citocinas y el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En algunas de tales formas de realización, el anticuerpo es un subtipo de IgG4, preferentemente, un IgG4P. En otra forma de realización, el anticuerpo se fija al CD200R humano y al mono macaca fascicularis.

La presente divulgación también proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-CD200R humano, que comprende: a) el cultivo de una célula de mamífero capaz de expresar el anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: 1) una HCVR que comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y 2) una LCVR que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, una LCDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y b) la recuperación del anticuerpo. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un

proceso para producir un anticuerpo contra CD200R, que comprende: a) cultivar una célula de mamífero capaz de expresar el anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: 1) una HCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y 2) una LCVR que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; y b) recuperar el anticuerpo. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-CD200R humano, que comprende: a) cultivar una célula de mamífero capaz de expresar el anticuerpo, en donde el anticuerpo comprende: 1) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; y 2) una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y b) recuperar el anticuerpo. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un proceso para producir un anticuerpo anti-CD200R humano, que comprende: a) cultivar una célula de mamífero capaz de expresar el anticuerpo, en donde el anticuerpo consiste de dos cadenas pesadas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y dos cadenas livianas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; y b) recuperar el anticuerpo.

En una forma de realización, un anticuerpo de la presente invención no provoca una liberación significativa de citocinas. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En una forma de realización preferida, el anticuerpo no provoca una liberación significativa de citocinas y el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R. En algunas de tales formas de realización, el anticuerpo es un subtipo de IgG4, preferentemente, un IgG4P. En otra forma de realización, el anticuerpo se fija al CD200R humano y al mono macaca fascicularis.

La presente divulgación también proporciona el anticuerpo contra CD200R que se produce por los procesos mencionados anteriormente. La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo contra CD200R que se produce por el proceso mencionado anteriormente y un portador, diluyente o excipiente.

La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12. La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13. La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la

HC del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 9. En una forma de realización, la molécula de ADN que codifica la HC del anticuerpo está dada por la SEQ ID NO: 12. La presente divulgación también proporciona una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la LC del anticuerpo cuya secuencia de aminoácidos es la secuencia de SEQ ID NO: 10. En una forma de realización, la molécula de ADN que codifica la LC del anticuerpo está dada por la SEQ ID NO: 13.

La presente divulgación también proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN compuesta por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12. La presente divulgación también proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN compuesta por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 13. La presente divulgación también proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN compuesta por un polinucleótido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, asma u otros trastornos inflamatorios, donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad eficaz de un anticuerpo de la presente invención

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo de la presente invención para usar en un tratamiento.

La presente invención también proporciona un anticuerpo de la presente invención para usar en el tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, asma u otros trastornos inflamatorios.

La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo de la presente invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, asma u otros trastornos inflamatorios.

En una forma de realización, la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria. En otra forma de realización, la enfermedad es una enfermedad alérgica. En otra forma de realización, la enfermedad es asma. En algunas formas de realización, la enfermedad es urticaria idiopática crónica (también denominada en la

presente como urticaria espontánea crónica (CSU)), enfermedad celíaca (que incluye, entre otras, enfermedad celíaca refractaria tipo II), alergia, enfermedad alérgica crónica, alergias alimentarias, esofagitis eosinofílica, síndrome de activación de macrófagos (MAS), asma, esclerodermia, pénfigo, enfermedad del intestino irritable (IBD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple (MS), artritis reumatoide (RA), enfermedad de injerto contra huésped (GvHD), psoriasis, mastocitosis, enfermedad inflamatoria de la piel o dermatitis atópica. En otras formas de realización, la enfermedad es dermatitis de contacto alérgica, alergias estacionales, tratamiento y prevención de anafilaxia, penfigoide ampolloso y otras enfermedades ampollosas autoinmunitarias, hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis pulmonar idiopática, miastenia gravis, vasculitis y miositis. En una forma de realización particular, la enfermedad alérgica crónica es fiebre del heno o rinitis alérgica. En una forma de realización preferida, la enfermedad es dermatitis atópica.

La presente invención proporciona un anticuerpo que se fija a CD200R humano, en donde el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R y en donde el anticuerpo no provoca una liberación significativa de citocinas. En una forma de realización, el anticuerpo demuestra agonismo contra CD200R y falta de liberación de citocina significativa similar al anticuerpo contra I-4P que demuestra agonismo contra CD200R y falta de liberación de citocina significativa. En una forma de realización, el anticuerpo agonista contra CD200R no causa una liberación significativa de citocinas en comparación con un anticuerpo IgG1 de tipo silvestre (sin mutaciones en la porción Fc) (que causa una liberación significativa de citocinas, especialmente la liberación de IFN-γ). En una forma de realización particular, la presente invención proporciona un anticuerpo agonista contra CD200R, en donde el anticuerpo no causa una liberación de citocinas significativa en comparación con un anticuerpo IgG1 de tipo silvestre que tiene las mismas CDR que el anticuerpo agonista contra CD200R. En una forma de realización, se detecta una liberación de citocina significativa comparando la cantidad de citocina presente en las muestras de sangre incubadas con el anticuerpo y la cantidad de citocina presente en las muestras de sangre sin incubación con el anticuerpo y determinando la presencia de una liberación significativa de citocina si la cantidad de la citocina presente en la muestra de sangre incubada con el anticuerpo es al menos tres veces mayor que la cantidad de citocina presente en la muestra de sangre sin anticuerpo.

En una forma de realización, el anticuerpo comprende una HCVR y una LCVR,

en donde la HCVR comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la LCVR comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 está dada por SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 está dada por SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 está dada por SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 está dada por SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 está dada por SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 está dada por SEQ ID NO: 6. En una forma de realización, el anticuerpo comprende una HCVR y una LCVR, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR está dada por SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR está dada por SEQ ID NO: 8.

La presente invención proporciona un anticuerpo de la presente invención que fija al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o todos los Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb, y Fcɣ RIIIA_158V.

En una forma de realización, el anticuerpo fija Fcɣ RI con una afinidad de fijación de alrededor de 70 pM a alrededor de 500 pM. En otra forma de realización, el anticuerpo fija Fcɣ RIIA_131H con una afinidad de fijación de alrededor de 2 µM a alrededor de 5 µM. En otra forma de realización, el anticuerpo fija Fcɣ RIIA_131R con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 5 µM. En otra forma de realización, el anticuerpo fija Fcɣ RIIb con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 4 µM. En otra forma de realización, el anticuerpo fija Fcɣ RIIIA_158V con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 6 µM. En otra forma de realización, el anticuerpo fija además Fcɣ RIIIA_158F con una afinidad de fijación mayor de 9 µM.

En una forma de realización, las afinidades de fijación del anticuerpo al receptor son de alrededor de 70 pM a alrededor de 500 pM a Fcɣ RI, alrededor de 2 µM a alrededor de 5 µM a Fcɣ RIIA_131H, alrededor de 1 µM a alrededor de 5 µM a Fcɣ RIIA_131R, alrededor de 1 µM a alrededor de 4 µM a Fcɣ RIIb, alrededor de 1 µM a alrededor de 6 µM a Fcɣ RIIIA_158V, y mayor de 9 µM a Fcɣ RIIIA_158F. En una forma de realización de mayor particularidad, las afinidades de fijación del anticuerpo al receptor son de alrededor de 400 pM a Fcɣ RI, alrededor de 4 µM a Fcɣ RIIA_131H, alrededor de 2 µM a Fcɣ RIIA_131R, alrededor de 2 µM a Fcɣ RIIb, alrededor de 4 µM a Fcɣ RIIIA_158V, y mayor de 10 µM a Fcɣ RIIIA_158F. En una forma de realización adicional, el anticuerpo no fija C1q. En algunas formas de realización, la afinidad de fijación se determina por resonancia de plasmones superficial a 25 °C. En otras formas de realización, la fijación a C1q se determina mediante ELISA.

Como se usa en la presente, "CD200R" se refiere al receptor CD200. Como se usa en la presente, "hCD200R" o "CD200R humano" se refiere a un CD200R humano de tipo silvestre, y, preferentemente, a un CD200R humano de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 15.

Los términos "*cyno*", "macaca fascicularis" o "mono macaca fascicularis" se usan indistintamente en la presente. Cuando se usa en referencia a un polipéptido CD200R, a menos que se indique lo contrario, se pretende que los términos se refieran al CD200R de mono macaca fascicularis de tipo silvestre y, preferentemente, a un CD200R de mono macaca fascicularis de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 16. Los términos "CD200RLa" o "forma de activación" se refieren a un CD200R de mono macaca fascicularis que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 17. CD200RLa es un homólogo cercano del CD200R humano pero con la actividad opuesta (activadora). Por lo tanto, un anticuerpo agonista contra CD200R preferido fija CD200RLa con una afinidad significativamente reducida en comparación con la fijación de anticuerpo a CD200R.

Como se usa en la presente, "anticuerpo agonista contra CD200R humano" o "anticuerpo agonista anti-CD200R humano" se refiere a un anticuerpo que se fija al CD200R humano, y cuando se administra *in vitro* o *in vivo*, da como resultado una respuesta inmunosupresora lograda, tal como al menos una actividad deseada significativamente disminuida, tal como una reducción deseada en la producción de IL-8. Como se usa en la presente, los términos "producción" y "secreción", en su relación con las citocinas, se usan indistintamente.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, se refiere a un complejo polipeptídico diseñado por ingeniería genética, no natural, que tiene dos cadenas pesadas (HC) y dos cadenas livianas (LC), de modo que las cadenas pesadas y las cadenas livianas están interconectadas por puentes disulfuro, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG. Cada cadena pesada está compuesta por una HCVR de terminal N y una región constante de la cadena pesada. Cada cadena liviana está compuesta por una LCVR de terminal N y una región constante de cadena liviana. Cuando se expresan en ciertos sistemas biológicos, los anticuerpos se glicosilan en la región Fc. Típicamente, la glicosilación se produce en la región Fc del anticuerpo en un sitio de N-glicosilación altamente conservado. Típicamente, los N-glicanos se fijan a la asparagina. Los anticuerpos también pueden estar glicosilados en otras posiciones.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser un anticuerpo IgG1 o IgG4. Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos IgG4.

Un anticuerpo IgG4 puede tener una mutación S228P dentro de la HC (es decir, IgG4P), que se sabe que elimina la formación de medio anticuerpo común para la subclase de IgG4 humana.

La región constante de las cadenas pesadas contiene dominios CH1, CH2 y CH3. CH1 viene después de la HCVR; CH1 y HCVR forman la porción de la cadena pesada de un fragmento de fijación a antígeno (Fab), que es la parte de un anticuerpo que se fija a los antígenos. CH2 viene después de la región bisagra y antes de CH3. CH3 viene después de CH2 y está en el extremo del terminal carboxi de la cadena pesada. La región constante de las cadenas livianas contiene un dominio, CL. CL viene después de la LCVR; CL y LCVR forman la porción de cadena liviana de un Fab.

Las regiones HCVR y LCVR del anticuerpo de la presente invención también pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones determinantes de complementariedad ("CDR"), intercaladas con regiones más conservadas, llamadas regiones marco ("FR"). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino hasta el terminal carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En la presente, las tres CDR de la cadena pesada se denominan "HCDR1, HCDR2 y HCDR3", y las tres CDR de la cadena liviana se denominan "LCDR1, LCDR2 y LCDR3". Las CDR contienen la mayoría de los residuos que forman interacciones específicas con el antígeno. La definición de CDR de Kabat (Kabat, *et al*., Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-93 (1971); Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Publicación NIH N.° 91-3242 (1991)) se basa en la variabilidad de la secuencia de anticuerpos. La definición de CDR de Chothia (Chothia et al., "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 196, 901-917 (1987); Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997)) se basa en estructuras tridimensionales de anticuerpos y topologías de los bucles de CDR. Las definiciones de CDR de Chothia son idénticas a las definiciones de CDR Kabat con la excepción de HCDR1 y HCDR2. La definición de CDR de North (North et al., "A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations", Journal of Molecular Biology, 406, 228-256 (2011)) se basa en el agrupamiento de propagación por afinidad con un gran número de estructuras cristalinas. Para los fines de la presente invención, la asignación de aminoácidos a los dominios CDR dentro de las regiones LCVR y HCVR de los anticuerpos de la presente invención se basa en la conocida convención de numeración de Kabat y la convención

de numeración North. En el caso de las CDR de cadena liviana de los anticuerpos de la presente invención, se usan las definiciones de CDR de North. En la cadena pesada, tanto HCDR1 como HCDR3 también usan la definición de North. HCDR2 utiliza un híbrido de definiciones de North y Kabat. La definición de North se usa para identificar el sitio de terminal N inicial, mientras que la de Kabat se usa para definir la última posición.

La presente invención contempla que los anticuerpos de la presente invención sean anticuerpos humanos o humanizados. En el contexto de los anticuerpos monoclonales, los términos "humano" y "humanizado" son bien conocidos por las personas del oficio de nivel medio (Weiner LJ, J. Immunother. 2006; 29: 1-9; Mallbris L, *et al.*, J. Clin. Aesthet. Dermatol. 2016; 9: 13-15).

Una molécula de ADN de la presente invención es una molécula de ADN que comprende una secuencia de polinucleótidos no natural que codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los polipéptidos en un anticuerpo de la presente invención (por ejemplo, cadena pesada, cadena liviana, cadena pesada variable y cadena liviana variable).

Un ADN aislado que codifica una región HCVR se puede convertir en un gen de la cadena pesada de longitud completa al ligar operativamente el ADN que codifica la HCVR a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de la cadena pesada. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana, así como de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse, por ejemplo, mediante amplificación por PCR estándar.

Un ADN aislado que codifica una región LCVR se puede convertir en un gen de la cadena liviana de longitud completa al ligar operativamente el ADN que codifica la LCVR a otra molécula de ADN que codifica una región constante de la cadena liviana. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena liviana humana, así como de otros mamíferos, se conocen en la técnica. Los fragmentos de ADN que comprenden estas regiones se pueden obtener mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda. Preferentemente, para los anticuerpos de la presente invención, la región constante de la cadena liviana es una región constante kappa.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden expresarse en una célula huésped después de que las secuencias se hayan ligado operativamente a una secuencia de control de la expresión. Por lo general, los vectores de expresión son

replicables en los organismos huésped ya sea como episomas o como una parte integral del ADN cromosómico huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contendrán marcadores de selección, por ejemplo, tetraciclina, neomicina y dihidrofolato reductasa, para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas.

Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse fácilmente en células de mamíferos, cuyos ejemplos no limitativos incluyen células CHO, NS0, HEK293 o COS. Las células huésped se cultivan mediante técnicas conocidas en la técnica.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótidos de interés (por ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos del anticuerpo y las secuencias de control de la expresión) pueden transferirse a la célula huésped mediante métodos conocidos, que varían según el tipo de huésped celular.

Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas para purificar proteínas, que incluyen, entre otros, anticuerpos, y tales métodos son conocidos en la técnica.

Un anticuerpo de la presente invención, o una composición farmacéutica que lo comprende, puede administrarse por vías parenterales, cuyos ejemplos no limitativos son la administración subcutánea y la administración intravenosa. Un anticuerpo de la presente invención puede administrarse a un paciente con portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables en dosis únicas o múltiples. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22da edición (2012), A. Loyd et al., Pharmaceutical Press) y comprenden un anticuerpo, como se describe en la presente, y uno o más portadores, diluyentes o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

Como se usa en la presente, los términos "enfermedad autoinmunitaria" y "trastorno autoinmunitario" se usan de manera indistinta y se refieren a condiciones indeseables que surgen de una reacción inmunitaria inapropiada o no deseada contra las autocélulas y/o autotejidos o células o tejidos trasplantados. El término "enfermedad autoinmunitaria" o "trastorno autoinmunitario" pretende incluir tales condiciones, independientemente de si están mediadas por respuestas inmunitarias humorales o celulares. La “alergia” (o “enfermedad alérgica”) es una enfermedad impulsada por linfocitos T colaboradores 2 (TH2) que se desarrolla principalmente a partir de la actividad de los linfocitos TH2. Las enfermedades de ejemplo

contempladas para ser tratadas por los anticuerpos de la invención descritos en la presente incluyen urticaria idiopática crónica, enfermedad celíaca (que incluye, entre otras, enfermedad celíaca refractaria tipo II), alergia, enfermedad alérgica crónica (como fiebre del heno o rinitis alérgica), alergias alimentarias, esofagitis eosinofílica, MAS, asma, esclerodermia y también pénfigo, IBD, SLE, MS, RA, GvHD, psoriasis, mastocitosis, enfermedad inflamatoria de la piel y dermatitis atópica. En otras formas de realización, la enfermedad contemplada para ser tratada por los anticuerpos de la invención descritos en la presente incluye es dermatitis de contacto alérgica, alergias estacionales, tratamiento y prevención de anafilaxia, penfigoide ampolloso y otras enfermedades ampollosas autoinmunitarias, hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis pulmonar idiopática, miastenia gravis, vasculitis y miositis.

Los términos "urticaria idiopática crónica" y "urticaria espontánea crónica (CSU)" se usan indistintamente en la presente.

Como se usa en la presente, el término "inmunidad innata" incluye el brazo de la respuesta inmunitaria que, en contraste con el brazo adaptativo de la respuesta inmunitaria, se requiere para iniciar y mantener una respuesta inmunitaria adaptativa (respuestas de anticuerpos y linfocitos T).

El término "que trata" (o "tratar" o "tratamiento") se refiere a ralentizar, interrumpir, detener, aliviar, paralizar, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existente.

"Cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un anticuerpo agonista anti-CD200R humano de la presente invención o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de este tipo que provocará la respuesta médica o biológica de o el efecto terapéutico deseado en un tejido, sistema, animal, mamífero o humano que está siendo buscado por el investigador, médico u otro profesional de la salud. Una cantidad eficaz del anticuerpo puede variar de acuerdo con diversos factores, tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo es superado por los efectos beneficiosos desde el punto de vista terapéutico. Dicho beneficio incluye uno o más de los siguientes: una mayor tolerancia inmunitaria de los órganos trasplantados; enfermedad o trastorno autoinmunitario estabilizado; o la mejora de los signos o síntomas de un trastorno autoinmunitario, etc. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso

de técnicas conocidas y la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Una cantidad eficaz de un anticuerpo agonista contra CD200R antihumano de la presente invención puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples. Además, se puede administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención en múltiples dosis de cantidades que serían menores que una cantidad eficaz si no se administra más de una vez. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente, el médico que diagnostica considera una serie de factores que incluyen, entre otros: la talla (peso o masa), área de superficie corporal, edad y salud general del paciente; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado o la participación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto específico que se administra; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación que se administra; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes. Una dosis semanal, cada dos semanas, mensual o trimestral parenteral (que incluye, entre otras, subcutánea, intramuscular y/o intravenosa) puede ser, por ejemplo, de alrededor de 50 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 125 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 300 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 350 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 400 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 450 mg a alrededor de 500 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 125 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 300 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 350 mg a alrededor de 400 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 125 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 150 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 175 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 200 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 250 mg a alrededor de 300 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 125 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 150 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 175 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 200 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 250 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 200 mg, de

alrededor de 125 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 150 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 175 mg a alrededor de 200 mg, de alrededor de 50 mg a alrededor de 175 mg, de alrededor de 75 mg a alrededor de 175 mg, de alrededor de 100 mg a alrededor de 175 mg, de alrededor de 125 mg a alrededor de 175 mg, o de alrededor de 150 mg a alrededor de 175 mg. Una dosis semanal, cada dos semanas, mensual o trimestral parenteral (incluida, entre otras, subcutánea, intramuscular y/o intravenosa) puede ser de alrededor de 0,5 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 6 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 7 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg de alrededor de 8 mg/kg a alrededor de 10 mg/kg, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 6 mg/kg a alrededor de 8 mg/kg, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 6 mg/kg, de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 6 mg/kg, de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 6 mg/kg, de alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 6 mg/kg, de alrededor de 5 mg/kg a alrededor de 6 mg/kg, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, de alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, de alrededor de 1 mg/kg a alrededor de 4 mg/kg, de alrededor de 2 mg/kg a alrededor de 4 mg/kg, de alrededor de 3 mg/kg a alrededor de 4 mg/kg, de alrededor de 3,5 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg, o alrededor de 4 mg/kg a alrededor de 5 mg/kg.

Sin embargo, también se prevén dosis por debajo o por encima de las dosis mencionadas en la presente, especialmente teniendo en cuenta las consideraciones de dosificación conocidas por las personas del oficio de nivel medio y/o descritas en la presente. El progreso del paciente que se está tratando puede controlarse mediante una evaluación periódica, y el ajuste de la dosis en consecuencia si es necesario.

Como se usa en la presente descripción, el término "respuesta eficaz" de un paciente o capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento se refiere al beneficio clínico o terapéutico que se imparte a un paciente tras la administración de un anticuerpo de la presente divulgación. Dicho beneficio incluye uno o más de los siguientes: una mayor tolerancia inmunitaria de los órganos trasplantados; enfermedad o trastorno autoinmunitario estabilizado; o mejora de los signos o síntomas de un

trastorno autoinmunitario, etc.

Como se usa en la presente, "liberación significativa de citocinas" se refiere a un aumento significativo en las citocinas medibles que pueden detectarse mediante métodos conocidos por personas del oficio de nivel medio. Por ejemplo, se puede detectar una liberación significativa de citocinas en muestras de sangre humana mediante ELISA, en donde los niveles de citocinas en sangre no estimulada se comparan con los niveles de citocinas en sangre incubada con anticuerpo. En algunos de estos estudios, por ejemplo, se puede detectar una liberación significativa de citocinas si los niveles de IFN-γ son al menos tres veces mayores en la sangre incubada con anticuerpos en comparación con los niveles en sangre no estimulada.

Una ventaja potencial de los métodos que se describen en la presente divulgación es la posibilidad de producir un alivio marcado y/o prolongado en un paciente que sufre un trastorno autoinmunitario, enfermedad alérgica, asma u otros trastornos inflamatorios, con un perfil de seguridad aceptable que incluye tolerabilidad, toxicidades y/o eventos adversos aceptables, de modo que el paciente se beneficie del método de tratamiento en general. La eficacia del tratamiento de la presente divulgación se puede medir mediante diversos criterios de valoración que se usan comúnmente en la evaluación de tratamientos para diversos trastornos autoinmunitarios, que incluyen, entre otros, el American College of Rheumatology (ACR) 20, ACR50, ACR70, el índice de área y gravedad de la psoriasis (PASI) 50, PASI75, PASI90, PASI100, y el índice de actividad de la enfermedad de lupus eritematoso sistémico (SLEDAI). Se pueden emplear opcionalmente otros diversos enfoques para determinar la eficacia de cualquier tratamiento particular de la presente invención, que incluyen, por ejemplo, marcadores de la activación celular inmunitaria, mediciones de la inflamación, visualización de las mediciones de los biomarcadores dependientes del ciclo celular y/o medición de la respuesta a través de evaluaciones del dolor.

Ejemplo: expresión y purificación de anticuerpos

Los anticuerpos agonistas anti-CD200R humanos de la presente invención pueden expresarse y purificarse esencialmente de la siguiente manera. Una célula huésped apropiada, tal como HEK 293 o CHO, se puede transfectar de forma transitoria o estable con un sistema de expresión para segregar anticuerpos usando una relación de vector HC:LC predeterminada óptima (tal como 1:3 o 1:2) o un sistema de vector único que codifica tanto la HC y la LC. Los medios clarificados, en los que se ha segregado el anticuerpo, se pueden purificar mediante cualquiera de las muchas

técnicas de uso común. Por ejemplo, el medio se puede aplicar convenientemente a una columna MabSelect® (GE Healthcare) o una columna KappaSelect (GE Healthcare) para el fragmento Fab, que se ha equilibrado con un amortiguador compatible, tal como una solución salina amortiguada con fosfato (pH 7,4). La columna se puede lavar para eliminar los componentes de fijación no específicos.

El anticuerpo fijado puede eluirse, por ejemplo, mediante un gradiente de pH (tal como 20 mM de amortiguador Tris, pH 7,0, a 10 mM de amortiguador de citrato de sodio, pH 3,0, o solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4, a 100 mM de amortiguador de glicina, pH 3,0). Se pueden detectar fracciones de anticuerpos, tal como por SDS-PAGE, y luego se pueden agrupar. La purificación adicional es opcional, dependiendo del uso previsto. El anticuerpo puede concentrarse y/o esterilizarse por filtración mediante el uso de técnicas comunes. El agregado soluble y los multímeros pueden eliminarse de forma eficaz mediante técnicas comunes, que incluyen exclusión por tamaño, interacción hidrófoba, intercambio iónico, multimodal, o cromatografía con hidroxiapatita. La pureza del anticuerpo después de estas etapas de cromatografía está entre alrededor de 95 % y alrededor de 99 %.

En particular, la glicina de terminal C del anticuerpo I-4P o la lisina de terminal C del anticuerpo I-IgG1 pueden truncarse después de la traducción. Además, la glutamina del terminal N del anticuerpo I-4P o el anticuerpo I-IgG1 puede convertirse en ácido piroglutámico.

El producto puede mantenerse refrigerado, congelarse inmediatamente a -70 ºC, o puede liofilizarse. Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO para los anticuerpos humanizados de ejemplo de la presente invención se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de anticuerpos agonistas anti-CD200R humanos de ejemplo.

Anticuerpo SEQ ID NO						
Anticuerpo	**HCDR1**	**HCDR2**	**HCDR3**	**LCDR1**	**LCDR2**	**LCDR3**
Anticuerpo I	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6

Anticuerpo	**HCVR**	**LCVR**
Anticuerpo I	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8

Anticuerpo	**HC**	**LC**
Anticuerpo I-4P	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10

Ejemplo: el anticuerpo I-4P se fija al CD200R humano y de mono macaca fascicularis

La resonancia de plasmones superficial (SPR) a 37 °C se realiza para determinar la cinética de fijación y la afinidad del anticuerpo I-4P con el CD200R humano, el CD200R del mono macaca fascicularis y el CD200RLa del mono macaca fascicularis (en la presente también denominado "forma de activación" del mono macaca fascicularis).

El instrumento Biacore® T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), los reactivos Biacore y el software de evaluación Scrubber2 Biacore® (Biologics 2008) se utilizan para el análisis SPR de la fijación del anticuerpo I-4P. Se prepara un chip CM4 (Biacore P/N BR-1006-68) utilizando el método de acoplamiento de amina EDC/NHS del fabricante (Biacore P/N BR-1000-50). Brevemente, las superficies de las 4 celdas de flujo (FC) se activan inyectando una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante 7 minutos a 10 µl/minuto. La proteína A (Calbiochem P/N 539202) se diluye a 100 µg/ml en acetato de 10 mM, amortiguador de pH 4,5 y se inmoviliza durante aproximadamente 400 RU en las 4 celdas de flujo mediante inyección de 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto. Los sitios sin reaccionar se bloquean con una inyección de etanolamina de 7 minutos a 10 µl/minuto. Se usan inyecciones de 2 x 10 µl de glicina pH 1,5 para eliminar cualquier proteína asociada no covalentemente. El amortiguador de ejecución es 1x HBS EP + (Biacore P/N BR-1006-69).

Los receptores CD200 activadores humano, de mono macaca fascicularis (*cyno*) y de mono macaca fascicularis se purifican usando IMAC y cromatografía de exclusión por tamaño. El CD200R de ratón se genera por escisión del Factor Xa a partir de una proteína de fusión Fc de CD200R de ratón fabricada en el laboratorio. La etapa final de pulido para el receptor CD200R de ratón es la cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la fijación de CD200R humano y *cyno*, los anticuerpos se diluyen a 2,5 µg/ml en amortiguador de corrida, y se captura aproximadamente 150 RU de anticuerpo I-4P en las celdas de flujo 2 a 4 (capturado en RU). FC1 es la celda de flujo de referencia; por lo tanto, no se captura ningún anticuerpo en FC1. El CD200R humano y *cyno* se diluyen a 500 nM en amortiguador de corrida y luego se diluyen dos veces en serie en amortiguador de corrida a 3,9 nM. Se inyectan inyecciones duplicadas de cada concentración sobre todas las FC a 50 µl/minuto durante 250 segundos seguido de una fase de disociación de 1200 segundos. La regeneración se realiza inyectando 15 µl de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/minuto dos veces sobre todos

los FC. Los datos sustraídos de referencia se recopilan como FC2-FC1, FC3-FC1 y FC4-FC1. Las medidas se obtienen a 37 ºC. La afinidad (K_D) se calcula utilizando un modelo de "fijación 1:1 (Langmuir)" en la evaluación BIA.

Para la fijación de CD200R con activación *cyno*, los anticuerpos se diluyen a 2,5 µg/ml en amortiguador de corrida y se capturan aproximadamente 150 RU de anticuerpo I-4P en las celdas de flujo 2 a 4 (capturado en RU). FC1 es la celda de flujo de referencia. El CD200R con activación *cyno* se diluye a 8,1 µM en amortiguador de corrida y luego se diluye 2 veces en serie en amortiguador de corrida a 63,2 nM. Se inyectan inyecciones duplicadas de cada concentración sobre todas las FC a 50 µl/minuto durante 250 segundos seguido de una fase de disociación de 1200 segundos. La regeneración se realiza inyectando 15 µl de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/min dos veces sobre todos los FC. Los datos sustraídos de referencia se recopilan como FC2 FC1, FC3 FC1 y FC4-FC1. Las medidas se obtienen a 37 °C. La afinidad (K_D) se calcula utilizando el análisis de equilibrio de estado estacionario con el software de evaluación Scrubber 2 Biacore®.

Para la fijación a CD200R de ratón, los anticuerpos se diluyen a 2,5 µg/ml en amortiguador de corrida, y se capturan aproximadamente 150 RU de anticuerpo I-4P en las celdas de flujo 2 a 4 (capturado en RU). FC1 es la celda de flujo de referencia. El CD200R de ratón se diluye a 10 µM en amortiguador de corrida y luego se diluye 2 veces en serie en amortiguador de corrida a 78 nM. Se inyectan inyecciones duplicadas de cada concentración sobre todas las FC a 50 µl/minuto durante 250 segundos seguido de una fase de disociación de 1200 segundos. La regeneración se realiza inyectando 15 µl de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/min dos veces sobre todos los FC. Los datos sustraídos de referencia se recopilan como FC2 FC1, FC3 FC1 y FC4-FC1. Las medidas se obtienen a 37 °C. La afinidad (K_D) se calculó utilizando el análisis de equilibrio en estado estacionario con el software de evaluación Scrubber 2 Biacore®.

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos. Como se muestra en la Tabla 2, el anticuerpo I-4P se fija al CD200R humano y al CD200R de mono macaca fascicularis con una afinidad en el rango nM, y el anticuerpo I-4P se fija al receptor activador de CD200RLa con una afinidad en el rango µM. El anticuerpo I-4P se fija a CD200R de ratón con una afinidad de > 10 µM.

Tabla 2. Afinidad del anticuerpo I-4P a receptores CD200 humanos, *Cyno*, activadores *Cyno* y ratón medidos usando resonancia de plasmones superficial (SPR) a 37º C.

	Receptor	K_D Promedio	Desviación Estándar
Anticuerpo I-4P	Humano	5,6 nM	1,2
	Mono macaca fascicularis	2,3 nM	0,1
	Mono macaca fascicularis	2,5 µM	0,4
	*CD200R de ratón	> 10 µM	

n = El ensayo se realizó tres veces; *n = 1 vez ensayado

Estos datos demuestran que el anticuerpo I-4P fija el receptor activador de CD200RLa y el CD200R de ratón con afinidad reducida en comparación con la afinidad del anticuerpo I-4P al CD200R humano y CD200R de mono macaca fascicularis.

El anticuerpo I-4P demostró un perfil de fijación favorable, a pesar de la ingeniería sustancial para superar los problemas significativos asociados con la falta de reactividad cruzada entre CD200R humano y *cyno*, la isomerización en condiciones de estrés (impulsada principalmente por un residuo de ácido aspártico en LCDR1 (LC D28)) y un puente disulfuro no nativo entre HC CDR1 y CDR2. Por ejemplo, se usó un procedimiento de mutagénesis de saturación de residuos de CDR de cadena pesada y cadena liviana mediante la expresión de células de mamífero para determinar los cambios de CDR que cerraron la brecha de afinidad entre CD200R humano y *cyno*. Este procedimiento también se utilizó para encontrar un reemplazo de residuos para LC D28 sin comprometer la afinidad. Se cribó una segunda biblioteca de CDR utilizando un proceso a base de fagos, que condujo al descubrimiento de residuos de reemplazo no predecibles y no germinales para el disulfuro no nativo sin comprometer la afinidad de fijación de antígeno.

EJEMPLO: Fijación *in vitro* del anticuerpo I-4P a CD200R expresado en células

CD200R es un miembro de la "familia de receptores emparejados", lo que significa que existe un homólogo cercano con actividad activadora opuesta. Esta forma no se ha identificado en humanos, pero se han descrito transcripciones de ARNm de bajo nivel en sangre completa y testículos de monos macaca fascicularis (en la presente se hace referencia a la "forma de activación" del mono macaca fascicularis o a "CD200RLa de mono macaca fascicularis"). Por lo tanto, la forma de activación del mono macaca fascicularis podría presentar un problema de seguridad durante los

estudios de toxicología en monos macaca fascicularis.

Para determinar si el anticuerpo I-4P se fija al CD200R expresado en células y unido a la membrana del mono macaca fascicularis, humano, y la forma de activación de CD200RLa de macaca fascicularis, se utiliza citometría de flujo. Las células CHO se transfectan con CD200R humano (SEQ ID NO: 15), el CD200R de mono macaca fascicularis (SEQ ID NO: 16) o la forma de activación del mono macaca fascicularis (SEQ ID NO: 17) y se seleccionan para una alta expresión. Las células ($2^{e}5$) se suspenden en $1^{e}6$/50 µl en PBS para cada línea celular y se agrega colorante FL4 (colorante MultiCyt® Proliferation y Encoder FL4). El colorante FL4 se diluye 1:5000 para las células que expresan CD200R humano y *cyno*, 1:700 para las células que expresan la forma de activación del mono macaca fascicularis, y 1:50 para las células no transfectadas. El colorante se mezcla con las células y la mezcla se incuba a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavan dos veces con 10 ml de PBS y se centrifugan a 1200 RPM durante 5 minutos. Las células se mezclan luego en amortiguador FACS a $8^{e}5$ células/50 µl/cavidad.

Las células se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente con titulaciones de anticuerpos realizadas en amortiguador FACS. Las células se lavan una vez con amortiguador FACS y se agregan 100 µl de anticuerpo Fc antihumano conjugado con PE a una dilución 1:1000 a cada cavidad durante 15 minutos en la oscuridad a 4 ºC. Las células se lavan tres veces y luego se resuspenden en 150 µl de amortiguador FACS. Se agrega Sytox azul (2 µl/cavidad), las células se transfieren a una placa FACS y se ejecutan en un instrumento de citometría Fortessa LSRII (BD Biosciences). Los datos se analizan utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos. El anticuerpo I-4P se fija al CD200R de mono macaca fascicularis y al CD200R humano. El anticuerpo I-4P se fija a la forma de activación del mono macaca fascicularis similar a la fijación a las células de control no transfectadas. Estos datos demuestran que no hay fijación del anticuerpo I-4P a la forma de activación del mono macaca fascicularis; por lo tanto, puede haber una preocupación de seguridad reducida durante los estudios de toxicología en monos macaca fascicularis.

Ejemplo: el anticuerpo I-4P es un agonista contra CD200R

Para demostrar la actividad agonista del anticuerpo I-4P, se transfecta una línea celular de monocitos humanos U937 (ATCC, CRL1539.2) con el cADN para CD200R humano. La producción de citocinas, incluida la IL-8, a partir de estas células

puede ser inducida por complejos inmunes (IC) que se fijan y activan los receptores Fcγ. Para la estimulación de IC, el anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano se recubre con una placa de alta fijación durante la noche. Al día siguiente, se incuban $4x10^5$ células U937/cavidad que expresan CD200R con diferentes concentraciones de anticuerpo I-4P durante 1 hora en hielo antes de agregarlas a la placa prerecubierta para estimulación de CI y se incuban a 37 ºC durante 24 horas. Después de 24 horas, las células se centrifugan, se elimina el sobrenadante y se mide la concentración de IL-8 usando el kit MSD (Mesoscale Diagnostics).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos. Como se muestra en la Tabla 3, la reducción de IL-8 inducida por IC con el anticuerpo I-4P como porcentaje de inhibición en comparación con el control de isotipo a la concentración correspondiente. El IC_{50} relativo se basa en un ajuste logístico de cuatro parámetros de la pendiente del porcentaje de inhibición sobre la concentración. El promedio IC_{50} a partir de 3 experimentos independientes se determinó que era 0,2 µg/ml ± 0,02 µg/ml.

Tabla 3. Inhibición dependiente de la concentración de la secreción de IL-8 inducida por complejos inmunitarios en células que expresan CD200R humano.

Anticuerpo I-4P (µg/ml)	% promedio de inhibición de IL-8	SEM
0,01	-2,0	3,1
0,03	2,3	2,9
0,1	14,0	6,0
0,3	24,0	4,2
1	47,1	2,8
3	55,7	2,9
10	67,8	3,3
30	76,2	4,0

Estos datos demuestran que el anticuerpo I-4P puede inhibir la producción de IL-8 inducida por IC de una manera dependiente de la concentración.

También se examina la capacidad de los anticuerpos agonistas contra CD200R con diferentes cadenas principales de isotipo para agonizar CD200R e inhibir la liberación de IL-8 estimulada por inmunocomplejos de células U937 que expresan CD200R humano. Para la estimulación, el anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano se recubre a 10 µg/ml en una placa de alta fijación durante la noche. Al día siguiente, se incuban 4×10^5 células U937/cavidad que expresan CD200R con diferentes concentraciones del anticuerpo IgG4PAA (se sabe que las dos sustituciones de leucina a alanina (SLL228PAA) interrumpen las interacciones hidrófobas con FcγRs para eliminar la función efectora residual) o del anticuerpo I-4P durante 1 hora en hielo

antes de agregarlo a la placa recubierta previamente para la estimulación con CI seguido de una incubación a 37 °C durante 24 horas. Las células se centrifugan, se elimina el sobrenadante y se mide la concentración de IL-8 usando el kit MSD (Mesoscale Diagnostics) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de IL-8 se convierten en porcentaje de inhibición con respecto al control de isotipo. La concentración de IL-8 se representa gráficamente en comparación con la concentración de anticuerpos, y se utiliza un modelo logístico de 4 parámetros para ajustar el porcentaje de inhibición en comparación con la concentración logarítmica utilizando el software estadístico R. Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos (mostrados en la Tabla 4).

Tabla 4. Reducción dependiente de la concentración en la producción de IL-8

	IgG4PAA		IgG4SP	
Anticuerpo µg/ml	% promedio de inhibición de IL-8	SEM*	% promedio de inhibición de IL-8	SEM*
0,01	-3,2	6,0	15,4	3,7
0,03	-5,0	5,6	35,8	3,6
0,1	-10,4	10,1	44,0	3,0
0,3	15,0	5,3	80,0	2,8
1	16,9	3,9	73,8	1,8
3	35,5	4,1	82,0	2,6
10	45,4	1,7	87,1	1,4
30	53,5	3,2	86,4	1,5

*Error estándar de la media

Estos datos demuestran que IgG4PAA tiene una actividad inhibidora más débil (IC_{50} = 1,45 µg/ml) en comparación con el anticuerpo I-4P (IC_{50} = 0,07 µg/ml).

EJEMPLO: Se requiere la fijación del receptor Fcγ para el agonismo *in vivo*

La agrupación a través del receptor Fcγ en la balsa lipídica puede aumentar la potencia inhibitoria en las células inflamatorias. Para identificar si la interacción del receptor Fcγ es beneficiosa para el agonismo a través de CD200R, se diseñaron por ingeniería genética dos anticuerpos CD200R de ratón; uno para extirpar cualquier fijación al receptor Fcγ (mIgG2aAA) y uno para tener la fijación al receptor Fcγ funcional (mIgG2a). Ambas moléculas se prueban en dos modelos independientes de enfermedad inflamatoria inducida en ratones; modelo de dermatitis de contacto e inflamación de colon inducida por CD40.

Modelo de dermatitis de contacto: la capacidad de los anticuerpos agonistas CD200R antihumanos para tratar la dermatitis de contacto puede determinarse mediante un modelo de ratón *in vivo* realizado esencialmente como se describe a continuación (véase, por ejemplo, Tolstrup *et al*., Anti-inflammatory effect of a

retrovirus-derived immunosuppressive peptide in mouse models, BMC Immunology 2013, 14:51). Se anestesian ratones machos C57Bl/6J de 12 semanas de edad, se les afeita el abdomen y se aplican 100 µl de oxazalona al 3% en etanol en el área afeitada. Siete días después de la sensibilización, el anticuerpo IgG2a o IgG2aAA agonista contra CD200R se administra a 0,1, 1 o 10 mg/kg por vía subcutánea (SC), o un control de isotipo mIgG2a a 10 mg/kg SC para comparación. Cuatro horas después de la administración de anticuerpos, los ratones se anestesian, se mide el grosor basal de la oreja con calibradores y las orejas se exponen a 10 µl de oxazalona al 2% en etanol en cada lado de ambas orejas. Veinticuatro horas después de la exposición, se mide nuevamente el grosor de la oreja. La reacción de hipersensibilidad se evalúa midiendo la diferencia entre el grosor de la oreja antes y 24 horas después de la exposición. Las diferencias estadísticas del control de isotipo se determinan utilizando un ANOVA de 1 vía con la prueba posterior de Dunnett (GraphPad Prism).

Modelo de inflamación de colon inducida por CD40: la capacidad de los anticuerpos agonistas anti-CD200R humano para tratar el modelo de inflamación de colon inducida por CD40 puede determinarse mediante un modelo de ratón *in vivo* realizado esencialmente como se describe a continuación. Se inyecta a ratones RAG2N12 (B6.129S6-Rag2tm1Fwa N12; Taconic) hembras de 14 semanas de edad con 100 µg/anticuerpo de ratón anti-CD40 (clon BioXcel FGK4.5) para inducir inflamación de colon. Una hora después de la inducción de la enfermedad, el anticuerpo agonista contra CD200R IgG2a, IgG2aAA o el anticuerpo de control de isotipo se administran por vía subcutánea a 0,1, 1 o 10 mg/kg. Los animales se sacrifican seis días después y la inflamación de colon se determina midiendo la longitud y el peso del colon. La relación longitud-peso del colon se usa para determinar la inflamación de colon. Las diferencias estadísticas del control de isotipo se determinan utilizando un ANOVA de 1 vía con la prueba posterior de Dunnett (GraphPad Prism).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos.

Tabla 5. Inflamación de la oreja medida en el modelo de dermatitis de contacto por cambio en el grosor de la oreja (mm)

Grosor de la oreja (mm)		
	mIgG2a	**mIgG2aAA**
Control de isotipos	0,200 ± 0,05	0,200 ± 0,05
10 mg/kg	0,118 ± 0,03**	0,160 ± 0,03*
1,0 mg/kg	0,113 ± 0,06**	0,170 ± 0,04
0,1 mg/kg	0,176 ± 0,05	0,178 ± 00,3

*p<0,05; ** p <0,001. n = 5 / grupo

Tabla 6. Inflamación de colon medida en el modelo de inflamación del colon inducida por CD40 por relación peso-longitud (mg/cm)

Relación de longitud a peso de colon (mg/cm)		
	mIgG2a	**mIgG2aAA**
Control de isotipos	37 ± 1,1	37 ± 1,1
10 mg/kg	26 ± 0,8**	33 ± 0,7
1,0 mg/kg	29 ± 1,6*	36 ± 1,9
0,1 mg/kg	32 ± 2,6	36 (n=1)

n = 5/grupo, *p<0,05; ** p<0,001.

Estos datos demuestran que, en comparación con los controles de isotipo, el anticuerpo con función efectora completa (mIgG2a) exhibió una función inmunosupresora en ambos modelos. Sin embargo, la variante nula del receptor Fcγ (mIgG2aAA) fue mucho menos potente en el modelo de dermatitis de contacto y tuvo poco o ningún efecto en el modelo de inflamación de colon. La diferencia en la actividad no se debió al agotamiento de las células que expresan CD200R, ya que el anticuerpo IgG2a competente para el receptor Fcγ se demostró en un experimento independiente que no agota las células que expresan CD200R en ratones (datos no mostrados).

Estos datos demuestran que se requiere la fijación del receptor Fcγ para proporcionar un agonismo óptimo al CD200R para mediar una señal antiinflamatoria.

Ejemplo: anticuerpo I que se fija a los receptores Fcγ

Para determinar si el anticuerpo Fc afecta las características de fijación del anticuerpo I-4P a los receptores Fcγ, la fijación del anticuerpo I-4P, el anticuerpo I-IgG1 y el anticuerpo I-4PAA, a los dominios extracelulares (ECD) humanos del receptor FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa se miden mediante SPR a 25 °C. El anticuerpo I-IgG1 y el anticuerpo I-4PAA tienen las mismas CDR que el anticuerpo I-4P. El Anticuerpo I-IgG1 tiene HCVR, LCVR y LC idénticas al anticuerpo I-4P, pero el anticuerpo I-IgG1 tiene una HC cuya secuencia de aminoácidos está dada por SEQ ID NO: 11. El anticuerpo I-4PAA difiere del anticuerpo I-4P al tener una mutación SLL228PAA en la HC.

El instrumento Biacore® T100 y Biacore® 3000 (GE Healthcare, Piscataway, NJ), los reactivos Biacore® y el software de evaluación Scrubber2 Biacore® (Biologics 2008) se utilizan para el análisis SPR de la fijación de anticuerpos. Se prepara un chip CM5 (Biacore® P/N BR-1006-68) utilizando el método de acoplamiento de amina EDC/NHS del fabricante (Biacore® P/N BR-1000-50). Brevemente, las superficies de los 4 FC se activan inyectando una mezcla 1:1 de EDC/NHS durante 7 minutos a 10 µl/minuto. La proteína A (Calbiochem P/N 539202) se diluye a 100 µg/ml en acetato 10 mM, amortiguador de pH 4,5 y se inmoviliza durante aproximadamente 400 RU en las 4 celdas de flujo mediante inyección de 7 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/minuto. Los sitios sin reaccionar se bloquean con una inyección de etanolamina de 7 minutos a 10 µl/minuto. Se usan inyecciones de 2 x 10 µl de glicina pH 1,5 para eliminar cualquier proteína asociada de manera no covalente.

Los ECD de FcγR -FcγRI (CD64), FcγRIIA_131R y FcγRIIA_131H (CD32a), FcγRIIIA_158V, FcγRIIIA_158F (CD16a) y FcγRIIb (CD32b; receptor inhibidor) (véase, por ejemplo, Bruhns *et al*., Blood. 16 de abril de 2009; 113 16):3716-25) se producen a partir de la expresión de células CHO estables de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica y se purifican usando Sepharose IgG y cromatografía de exclusión por tamaño.

Para la fijación a FcγRI, los anticuerpos se diluyen a 2,5 µg/ml en amortiguador de corrida (1x HBS-EP + (Biacore® P/N BR-1006-69), y se capturan aproximadamente 150 RU de cada anticuerpo en las celdas de flujo 2 a 4 (capturado en RU) FC1 es la celda de flujo de referencia; por lo que no se captura ningún anticuerpo en FC1. FcγRI ECD se diluye a 200 nM en amortiguador de corrida y luego se diluye dos veces en serie en amortiguador de corrida a 0,78 nM. Se inyectan inyecciones duplicadas de cada concentración sobre todas las FC a 40 µl/minuto durante 120 segundos seguido de una fase de disociación de 1200 segundos. La regeneración se realiza inyectando 15 µl de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/minuto sobre todas las FC. Los datos sustraídos de referencia se recopilan como FC2-FC1, FC3-FC1 y FC4-FC1. Las medidas se obtienen a 25 ºC. La afinidad (K_D) se calcula utilizando un análisis de equilibrio en estado estacionario con el software de evaluación Scrubber 2 Biacore® o un modelo de "fijación 1:1 (Langmuir)" en la evaluación BIA.

Para la fijación de FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa, los anticuerpos se diluyen a 5 µg/ml en amortiguador de corrida, y se capturan aproximadamente 500 RU de cada variante en las celdas de flujo 2 a 4 (capturado en RU). FC1 es la celda de flujo de referencia. Los ECD del receptor Fcγ se diluyen a 10 µM en el amortiguador de corrida

y luego se diluyen 2 veces en serie en el amortiguador de corrida a 39 nM. Se inyectan inyecciones duplicadas de cada concentración sobre todas las FC a 40 µl/minuto durante 60 segundos, seguido de una fase de disociación de 120 segundos. La regeneración se realiza inyectando 15 µl de glicina 10 mM pH 1,5 a 30 µl/min sobre todas las FC. Los datos sustraídos de referencia se recopilan como FC2-FC1, FC3-FC1 y FC4-FC1. Las medidas se obtienen a 25 °C. La afinidad (K_D) se calcula utilizando el análisis de equilibrio de estado estacionario con el software de evaluación Scrubber 2 Biacore®.

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Parámetros de fijación *in vitro* del anticuerpo I-4P, el anticuerpo I-IgG1 y el anticuerpo I-4PAA al ECD del receptor Fcγ humano medido utilizando SPR a 25 ºC

Muestra	Ligando humano	KD promedio	Desviación estándar*
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RI	56,1 pM	2,2
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RI	229,0 nM	11,5
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RI	48,9 pM	2,2
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RI	273,3 nM	12,6
Anticuerpo I-4P	Fcγ RI	369,3 pM	9,2
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RIIA_131H	0,5 µM	0,0
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RIIA_131H	> 10 µM	
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RIIA_131H	0,5 µM	0,0
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RIIA_131H	> 10 µM	
Anticuerpo I-4P	Fcγ RIIA_131H	3,9 µM	0,3
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RIIA_131R	0,6 µM	0,0
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RIIA_131R	> 10 µM	
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RIIA_131R	0,6 µM	0,0
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RIIA_131R	> 10 µM	
Anticuerpo I-4P	Fcγ RIIA_131R	1,7 µM	0,1
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RIIb	2,8 µM	0,1
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RIIb	> 10 µM	
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RIIb	2,8 µM	0,1
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RIIb	> 10 µM	
Anticuerpo I-4P	Fcγ RIIb	2,2 µM	0,1
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RIIIA_158V	0,2 µM	0,0
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RIIIA_158V	8,9 µM	1,1
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RIIIA_158V	0,2 µM	0,0
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RIIIA_158V	> 10 µM	
Anticuerpo I-4P	Fcγ RIIIA_158V	4,3 µM	0,4
Anticuerpo de control IgG1	Fcγ RIIIA_158F	1,0 µM	0,1
Anticuerpo de control IgG4 PAA	Fcγ RIIIA_158F	> 10 µM	
Anticuerpo I-IgG1	Fcγ RIIIA_158F	0,9 µM	0,1
Anticuerpo I-4PAA	Fcγ RIIIA_158F	> 10 µM	
Anticuerpo I-4P	Fcγ RIIIA_158F	> 10 µM	

El ensayo se realizó tres veces independientes.
*La desviación estándar no se determinó para mediciones> 10 µM.

La Tabla 7 resume la afinidad (K_D) del anticuerpo I-IgG1, el anticuerpo I-4PAA y el anticuerpo I-4P con los ECD humanos del receptor FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb y FcγRIIIa medidos por SPR. Las características de fijación del anticuerpo I-4P demuestran la fijación a los receptores Fcγ con afinidades que están sustancialmente entre las afinidades de fijación del control IgG1/anticuerpo I-IgG1 y control IgG4

PAA/anticuerpo I-4PAA. Por ejemplo, los datos demuestran que el anticuerpo I-4P ha reducido la fijación al ECD del receptor FcγRIIIa en comparación con el anticuerpo I-IgG1 (que se puede atribuir a la liberación de citocinas en el análisis de sangre completa) pero aún tiene una mayor afinidad de fijación a los ECD del receptor FcγRI y FcγRIIb en comparación con el anticuerpo I-4PAA.

Se cree que las características de fijación demostradas por el anticuerpo I-4P a los FcγR contribuyen a una mayor eficacia *in vivo* sin causar una liberación significativa de citocinas.

Ejemplo: Mutantes Fc de IgG1 que se fijan a los receptores Fcγ

Se sabe que los anticuerpos IgG1 inducen la liberación de citocinas. Para determinar el mecanismo para la liberación de citocinas inducida por IgG1, se generan mutaciones de IgG1-Fc. Estos anticuerpos CD200R tienen diferentes CDR del anticuerpo I. Los anticuerpos en la Tabla 8 (IgG1, sin mutaciones, P331S, P331S + S267G, A330S + P331S + S267G, A330S + S267G, K322A, K322A + S267G y N325S + L328F + S267G) tienen CDR idénticos entre sí. El anticuerpo S267G tiene diferentes CDR de los otros anticuerpos mutantes y el anticuerpo I-4P.

Se genera una mutación S267G para reducir la fijación de FcγRIII (numeración de la UE: véase, por ejemplo, Kabat *et al*., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md. (1991); y Shields RL *et al*., High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to Fc gamma R. 2001 J. Biol. Chem 276, 6591-6604).

La mutación S267G también se combina con mutaciones que reducen la fijación de C1q sin afectar significativamente la fijación de FcγR (K322A, A330S y P331S; véase, por ejemplo, Oganesyan V *et al*., 2008 Structural characterization of a human Fc fragment engineered for lack of effector functions. Acta Crystallogr. D Biol. Chrystallogr. 64, 700-704; Idusogie, E *et al*., 2000 Mapping of the C1q Binding Site on Rituxan, a Chimeric Antibody with a Human IgG1 Fc. J. of Immunology, 164 (8) 4178-4184; y Tao MH y Morrison ML 1993 Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype- specific differences in complement activation. J. de Exp. Med., 178 (2), 661-667). También se generan mutaciones adicionales que reducen la fijación de FcγRIII y C1q al mismo tiempo que modulan la fijación a FcγRIIA y FcγRIIB (N325S+L328F; véase, por ejemplo, Shang L *et al*., 2014 Selective antibody intervention of Toll-like receptor 4 activation through FcγR tethering. J. Biol. Chem 289, 15309-18; Monnet E *et al,* 2017 Evidence of NI-0101 pharmacological activity, an anti-

TLR4 antibody, in a randomized phase I dose escalation study in healthy volunteers receiving LPS. Clin Pharmacol Ther. 2017 101, 200-208).

La fijación al receptorγ Fc se determina mediante Biacore®, y el IFNγ se determina mediante un ensayo multiplex basado en la plataforma Mesoscale, ambas como se describe en la presente. La fijación de C1q se determina mediante ELISA. Para el ELISA, una microplaca de 96 cavidades se recubre con 100 µl/cavidad de cada anticuerpo diluido en DPBS (Dulbecco's HyClone) con un rango de concentración de 10 µg/ml a 0,19 µg/ml. La prueba se realiza en cavidades duplicadas. La placa se sella y se incuba durante la noche a 4 °C. El reactivo de recubrimiento se elimina de cada cavidad y se agregan 200 µl/cavidad de reactivo de bloqueo de caseína (Thermo). La placa se sella y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente (RT). Cada cavidad se lava 3 veces con amortiguador de lavado (1 x TBE con Tween 20 al 0,05 %). Se agregan 100 µl/cavidad de C1q humano (MS Biomedical) a 10 µg/ml diluido en reactivo de bloqueo de caseína y se incuba durante 3 horas a temperatura ambiente. Luego, la placa se lava tres veces con amortiguador de lavado antes de 100 µl/cavidad de una dilución 1:800 veces de anti-C1q-HRP humano en oveja (Abcam #ab46191) en bloqueador de caseína y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava 6 veces con amortiguador de lavado y se agregan 100 µl/cavidad de sustrato TMB (Pierce) a cada cavidad y se incuban durante 7 minutos. Se agregan 100 µl de HCl 1 N a cada cavidad para detener la reacción. La densidad óptica se mide inmediatamente usando un lector de microplacas colorimétrico configurado a 450 nm.

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos (N=1; Tabla 8).

Tabla 8. Fijación de FcγR y C1q y medidas de liberación de citocinas en sangre completa con mutantes IgG1.

Mutación	FcγRI, pM	FcγRIIA_131H, μM	FcγRIIA_131R, μM	FcγRIIb, μM	FcγRIIIA_158V, μM	FcγRIIIA_158F, μM	C1q Elisa	Liberación de IFNγ en sangre completa[a]
Hu IgG1	55,2	0,71	1,03	4,2	0,28	2,59	++	ND
IgG1, sin mutaciones	46,4	0,69	1,04	4,23	0,27	2,12	+++	Sí
P331S	54,3	1,15	1,14	4,64	0,45	3,11	+	Sí
P331S + S267G	142,4	5,2	0,77	4,38	2,08	> 10	-	No
A330S + P331S + S267G	511,4	5,1	0,78	4,3	2,48	9,8	-	No
A330S + S267G	167,7	3,31	0,82	4,99	1,66	10,83	-	No
K322A	30,5	0,98	0,82	3,41	0,28	2,58	-	Sí
K322A + S267G	70,5	5,02	0,66	4,43	1,65	9,99	-	No
N325S + L328F	68,7	2,64	0,06	0,275	7,35	> 10	-	No
S267G	130,7	3,13	0,53	3,41	0,73	4,5		Sí
Anticuerpo de control IgG4P humano	384,7	5,12	2,89	3,31	5,47	> 10	-	No

[a]Cualquier liberación de citocinas significativamente por encima de los niveles de valor inicial en sangre completa es registrada como 'Sí', sin embargo, los niveles exactos sobre el valor inicial pueden variar.

Estos datos demuestran que la combinación de mutaciones que reducen la fijación de C1q y alteran la fijación de FcγR conduce a una falta de liberación de IFNγ sobre el valor inicial, lo que sugiere un perfil de seguridad más deseable cuando se administra a pacientes. Por ejemplo, la reducción de la fijación de C1q y la reducción de la fijación a FCγRIII (o FCγRI) da como resultado una falta de liberación de IFNγ sobre el valor inicial.

EJEMPLO: liberación de citocinas *in vitro*

La toxicidad clínica, incluido el síndrome de liberación de citocinas (SRC), se ha asociado con la administración de anticuerpos. El CRS, uno de los efectos adversos más graves asociados con los anticuerpos monoclonales, se caracteriza por altos niveles de activación de las células inmunitarias y la rápida liberación sistémica de citocinas proinflamatorias y puede ser potencialmente mortal. Es importante destacar que los modelos preclínicos no predicen adecuadamente el riesgo potencial de CRS. En consecuencia, se desarrolla un ensayo de liberación de citocinas *in vitro*

utilizando células sanguíneas humanas para mitigar los riesgos potenciales de CRS después de la administración de anticuerpos. El anticuerpo, en particular el anticuerpo IgG1, que se fija a los receptores Fcγ puede causar la liberación no deseada de citocinas.

Para determinar si el anticuerpo I-4P o el anticuerpo I-IgG1 inducen la liberación de citocinas de sangre completa humana no estimulada, se realiza un estudio de liberación de citocinas *in vitro*. La sangre completa recién extraída de seis humanos sanos se incuba con 100 µg/ml de anticuerpo I-4P, anticuerpo I-IgG1 o anticuerpo IgG1 de control durante 24 horas. El control positivo es un homólogo del anticuerpo IgG1 Campath-1H (anti-CD52) que se sabe que causa el síndrome de liberación de citocinas en la clínica. El control negativo es un anticuerpo hIgG1 que no causa la liberación de citocinas. Utilizando un ensayo multiplex disponible en el comercio basado en la plataforma Mesoscale, se miden diez citocinas que incluyen IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-13, IL-8, IL-12p70, IL-10 y TNF-α en sobrenadantes de cultivo celular.

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos. Como se muestra en la Tabla 9, la incubación de sangre completa con 10 µg/ml de anticuerpos de control positivo dio como resultado una producción robusta de citocinas para 9 de las 10 citocinas analizadas en la mayoría de los donantes. La incubación de sangre completa con el anticuerpo I-IgG1 indujo una liberación significativa de IFN-γ. La incubación de sangre completa con 100 µg/ml de anticuerpo I-4P o 100 µg/ml de IgG1 de control negativo no dio como resultado niveles significativos de ninguna de las citocinas evaluadas.

Tabla 9. Relación de cambio con respecto al valor inicial (muestra de control PBS); MEDIA ± SEM

Citocina	Anticuerpo I-IgG1	Anticuerpo I-4P	Control negativo	Control positivo
IFN-γ	10 ±19	0,9 ±0,08	0,8 ±0,06	612 ±431
IL-1β	1,8 ±3	1,19 ±2	1,04 ±1,4	3 ± 5
IL-2	0,36 ±0,14	1,7 ±0,133	1,9 ±0,86	1,33 ±1,3
IL-4	0,96 ±1,4	1,08 ±0,42	0,83 ±0,73	10 ±24
IL-6	1,25 ±1,8	1,17 ±0,17	1,03 ±0,13	15 ±18
IL-8	1,1 ±0,58	1,2 ±0,08	1,25 ±0,24	8,8 ±5
IL-10	0,88 ±0,11	1,25 ±0,15	1,26 ±0,3	3,9 ±2,6
IL-12p70	0,97 ±0,37	0,63 ±0,19	0,49 ±0,5	7 ±11
IL-13	1,18 ± 0,27	1,18 ±0,12	1,1 ±0,24	5,5 ±1,89
TNF-α	1,37 ±0,4	1,1 ±0,05	0,96 ±0,07	20 ±17

Estos datos demuestran que el anticuerpo I-4P no causa una liberación significativa de citocinas, y sugieren un bajo riesgo de liberación de citocinas en la

clínica después de la administración del anticuerpo I-4P.

EJEMPLO: el anticuerpo I no bloquea la fijación de CD200 a CD200R

Tanto CD200 como CD200R son moléculas expresadas en células y contienen dos dominios similares a Ig. Interactúan a través de sus dominios terminales NH2 compatibles con las interacciones inmunológicas de tipo sinapsis que ocurren entre las células mieloides y otras células que expresan CD200. Para determinar si el anticuerpo I -4P se fija a CD200R en presencia de ligando, se realizan experimentos de fijación conjunta en células HEL92.7.1, una línea celular de eritroblastoma humano que expresa CD200R, mediante citometría de flujo. Para el estudio, se incuban (se tratan previamente) células 2^{e5} con 300 nM de CD200Fc (Sistemas RD; proteína de fusión de la región de inmunoglobulina 1 Fc con CD200), anticuerpo I-4P, anticuerpo de control de isotipo o PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las células se lavan 3 veces y se incuban con bloque Fc (Miltenyi Biotec) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se tiñen con varias concentraciones de anticuerpo I-4P marcado con AF647 durante una hora a temperatura ambiente y luego se lavan y suspenden en amortiguador FACS para el análisis por citometría de flujo.

La mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI) se determina para cada concentración de anticuerpo I-4P marcado con AF647, y el MFI indica la cantidad de fijación en presencia de ligando. Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los datos de la Tabla 10.

Tabla 10. Fijación del anticuerpo en presencia de CD200.

Teñido	Sin tratamiento previo	Tratamiento previo		
Anticuerpo I-4P-AF647 (ug/ml)	Sin tratamiento previo (IMF)	Control de isotipos (MFI)	Anticuerpo I-4P (MFI)	CD200-Fc (MFI)
0	49,1	49,1	49,1	49,1
0,4	416	399	70,4	230
0,8	694	664	76,3	370
1,6	1184	1154	96,9	630
3,125	1979	1914	133	1068
6,25	3097	2987	200	1728
12,5	4216	4105	319	2641
25	5137	4916	496	3421
50	5651	5515	745	3957

Estos datos demuestran que el anticuerpo I-4P no bloquea al ligando CD200 de que se fije al CD200R humano (datos humanos de CD200-Fc en comparación con el control del isotipo y ningún dato de tratamiento previo). Los datos de tratamiento previo del anticuerpo I-4P sirven como control y demuestran una fijación reducida del

anticuerpo I-4P marcado seguido del tratamiento previo con el anticuerpo I-4P.

Se determinó que el epítopo para el anticuerpo I-4P estaba cerca de la membrana celular en el dominio 2 de CD200R (datos no mostrados).

EJEMPLO: el anticuerpo I-4P inhibe la hipersensibilidad de contacto en ratones humanizados

Para demostrar los efectos antiinflamatorios del anticuerpo I-4P, se compran ratones hembra huNOG-EXL (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug} Tg(SV40/HTLV-IL3,CSF2)10-7Jic/JicTac) en Taconic Biosciences a las 20 semanas de edad y se dejan aclimatar durante más de 1 semana. Los ratones se alojan de cuatro ratones por jaula a 22 ºC bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12 h y se les permite comida y agua a demanda. En el día 0, los ratones se anestesian con isoflurano al 5 %, se afeita su abdomen y se aplican 100 µl de oxazalona al 3 % en etanol al área afeitada. Cinco días después de la sensibilización, el anticuerpo I-4P se administra a 1 o 10 mg/kg por vía subcutánea (SC); el control del isotipo IgG4P se administra a 10 mg/kg SC para comparación. Cuatro horas después de la administración de anticuerpos, los ratones se anestesian con isoflurano al 5 %, el grosor de la oreja se mide con calibradores y las orejas se exponen con 10 µl de oxazalona al 2 % en etanol en cada lado de ambas orejas. El procedimiento de desafío se repite los días 10 y 14. La reacción de hipersensibilidad se evalúa midiendo la diferencia entre el grosor de la oreja antes y 24 horas después de la exposición.

Estadísticas: la inflamación se determina midiendo las diferencias en el grosor de la oreja antes y 24 horas después de la exposición para cada exposición. El porcentaje de inhibición se calcula a partir del grosor medio de la oreja de los controles de isotipo establecidos en 0 % de inhibición. Las diferencias estadísticas con respecto al control de isotipo se determinan utilizando un ANOVA de 1 o 2 vías con la prueba de Dunnett cuando sea apropiado (GraphPad Prism).

Al seguir esencialmente los procedimientos descritos anteriormente, se obtuvieron los siguientes datos. Como se muestra en la Tabla a continuación, un solo tratamiento con el anticuerpo I-4P a 1 o 10 mg/kg SC 4 horas antes de la primera exposición mejoró significativamente la respuesta inflamatoria después de la tercera exposición en comparación con los ratones tratados con isotipo.

Tabla 11.

Tratamiento	**Grosor de la oreja Delta (mm) ± SEM**	**% de inhibición del isotipo**	**Valor p**
Control de isotipos	0,108 ± 0,005	N/A	
Anticuerpo I-4P 10 mg/kg	0,056 ± 0,008	47,9 ± 7,8	0,0001
Anticuerpo I-4P 1 mg/kg	0,064 ± 0,007	41,4 ± 6,4	0,0001

SECUENCIAS

HCDR1 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 1)
KASGFSFSSGYYMA

HCDR2 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 2)
LIGVGSGSLWYAQKFQG

HCDR3 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 3)
ARHFALSDPFNL

LCDR1 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 4)
QASESIDSYLL

LCDR2 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 5)
KQASTLAS

LCDR3 de anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 6)
QNYYDISSND

Anticuerpo HCVR del anticuerpo I-4P y anticuerpo I- IgG1 (SEQ ID NO: 7)
XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVG
SGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWG
QGTLVTVSS
en donde Xaa en la posición 1 es glutamina o ácido piroglutámico

Anticuerpo LCVR de anticuerpo I-4P y anticuerpo I- IgG1 (SEQ ID NO: 8)
EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQQKPDQSPKLLIKQASTLASGVP
SRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYYDISSNDFGGGTKVEIK

Anticuerpo cadena pesada del anticuerpo I-4P (SEQ ID NO: 9)
XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVG
SGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGV

EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLX
en donde Xaa en la posición 1 es glutamina o ácido piroglutámico; y Xaa en la posición 446 es glicina o está ausente.

Cadena liviana de anticuerpo del anticuerpo I-4P y anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 10)

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCQASESIDSYLLWYQQKPDQSPKLLIKQASTLASGVP
SRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQNYYDISSNDFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada de anticuerpo de anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 11)

XVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFSFSSGYYMAWVRQAPGQGLEWMGLIGVG
SGSLWYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARHFALSDPFNLWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGX
en donde Xaa en la posición 1 es glutamina o ácido piroglutámico; y Xaa en la posición 450 es lisina o está ausente.

ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo I-4P (SEQ ID NO: 12)

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaaggcatctggatt
ctccttcagtagcggctactacatggcatgggtgcggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactgattggtg
ttggtagtggtagcctatggtacgcgcagaagttccaaggccgggtcaccatgaccagggacacgtccacgagcacag
tctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacattttgctctgtctgatcccttta
acttgtggggccagggcacactcgtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctgc
tccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcg
tggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcag
cgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacacca
aggtggacaagagagttgagtccaaatatggtcccccatgcccaccctgcccagcacctgagttcctgggggggaccatc

agtcttcctgttccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgt
gagccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccg
cgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaa
ggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagc
cccgagagccacaggtgtacaccctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcct
ggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggaaagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggagg
ggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggt

ADN que codifica la cadena liviana del anticuerpo I-4P y el anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 13)

gaaattgtgctgactcagtctccagactttcagtctgtgactccaaaggagaaagtcaccatcacctgccaggccagtga
gtcgattgatagctatttactgtggtaccagcagaaaccagatcagtctccaaagctcctcatcaagcaggcatccactct
ggcatctggggtcccctcgaggttcagtggcagtggatctgggacagatttcaccctcaccatcaatagcctggaagctg
aagatgctgcaacgtattactgtcaaaactattatgatattagtagtaatgatttcggcggagggaccaaggtggagatca
aacggaccgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcc
tgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccagga
gagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagacta
cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggg
gagagtgc

ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo I-IgG1 (SEQ ID NO: 14)

caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtttcctgcaaggcatctggatt
ctccttcagtagcggctactacatggcatgggtgcggcaggcccctggacaagggcttgagtggatgggactgattggtg
ttggtagtggtagcctatggtacgcgcagaagttccaaggccgggtcaccatgaccagggacacgtccacgagcacag
tctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtattactgtgcgagacattttgctctgtctgatcccttta
acttgtggggccagggcacactcgtcaccgtctcctcagctagcaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcc
tccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgt
ggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcag
cgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacacca
aggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgg
ggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtg
gtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag
acaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggct
gaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc

aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaa
ctacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggt
ggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccct
gtctccgggtaag

CD200R humano (SEQ ID NO: 15)

MLCPWRTANLGLLLILTIFLVAEAEGAAQPNNSLMLQTSKENHALASSSLCMDEKQITQ
NYSKVLAEVNTSWPVKMATNAVLCCPPIALRNLIIITWEIILRGQPSCTKAYRKETNETK
ETNCTDERITWVSRPDQNSDLQIRPVAITHDGYYRCIMVTPDGNFHRGYHLQVLVTPE
LTLFQNRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPEGDCATKQEYWSNGTVTVKSTCHWEVHN
VSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYIPYIILTIIILTIVGFIWLLKVNGCRKYK
LNKTESTPVVEEDEMQPYASYTEKNNPLYDTTNKVKASQALQSEVDTDLHTL

CD200R de mono macaca fascicularis (SEQ ID NO: 16)

MLCPWRTANLGLLLILAVFLVAEAEGAAQSNNSLMLQTSKENHTLASNSLCMDEKQIT
QNHSKVLAEVNISWPVQMARNAVLCCPPIEFRNLIVITWEIILRGQPSCTKTYRKDTNE
TKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQIHPVAITHDGYYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVT
PEVTLFESRNRTAVCKAVAGKPAAQISWIPAGDCAPTEQEYWGNGTVTVKSTCHWE
GHNVSTVTCHVSHLTGNKSLYIELLPVPGAKKSAKLYMPYVILTIIILTIVGFIWLLKISGC
RKYNLNKTESTSVVEEDEMQPYASYTEKNNPLYDTTNKVKASQALQSEVGTDLHTL

CD200RLa de mono macaca fascicularis (SEQ ID NO: 17)

MHTLGKMSASRLLISIIIMVSASSSSCMDGKQMTQNYSKMSAEGNISQPVLMDTNAML
CCPPIEFRNLIVIVWEIIIRGQPSCTKAYRKETNETKETNCTDERITWVSTPDQNSDLQI
HPVAITHDGYYRCIMATPDGNFHRGYHLQVLVTPEVTLFQSRNRTAVCKAVAGKPAA
QISWIPAGDCAPTEHEYWGNGTVTVESMCHWGDHNASTMTCHVSHLTGNKSLYIKL
NSGLRTSGSPALDLLIILYVKLSLFVVILVTTGFVFFQRINYVRKSL

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que fija CD200R humano, que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena liviana (LCVR), en donde la HCVR comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la LCVR comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCDR1 está dada por SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 está dada por SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 está dada por SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 está dada por SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 está dada por SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 está dada por SEQ ID NO: 6.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una HCVR y una LCVR, en donde la secuencia de aminoácidos de la HCVR está dada por SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de la LCVR está dada por SEQ ID NO: 8.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 7 es glutamina.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 7 es ácido piroglutámico.
5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo no causa una liberación significativa de citocinas.
6. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo agonista contra CD200R.
7. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo se fija al menos a uno de Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V.
8. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo se fija al menos a dos de Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V.
9. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo se fija al menos a tres de Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V.
10. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo se fija al menos a cuatro de Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V.

11. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V.
12. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RI con una afinidad de fijación de alrededor de 70 pM a alrededor de 500 pM.
13. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RIIA_131H con una afinidad de fijación de alrededor de 2 µM a alrededor de 5 µM.
14. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RIIA_131R con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 5 µM.
15. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RIIb con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 4 µM.
16. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en donde el anticuerpo se fija a Fcɣ RIIIA_158V con una afinidad de fijación de alrededor de 1 µM a alrededor de 6 µM.
17. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en donde el anticuerpo se fija además a Fcɣ RIIIA_158F con una afinidad de fijación de más de 9 µM.
18. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-17, en donde las afinidades de fijación son:
    (i) alrededor de 70 pM a alrededor de 500 pM a Fcɣ RI;
    (ii) alrededor de 2 µM a alrededor de 5 µM a Fc F RIIA_131H;
    (iii) alrededor de 1 µM a alrededor de 5 µM a Fc F RIIA_131R;
    (iv) alrededor de 1 µM a alrededor de 4 µM a Fc F RIIb;
    (v) alrededor de 1 µM a alrededor de 6 µM a Fc F RIIIA_158V; y
    (vi) mayor de 9 µM a Fcɣ RIIIA_158F.
19. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-18, en donde las afinidades de fijación son:
    (i) alrededor de 400 pM a Fcɣ RI;
    (ii) alrededor de 4 µM a Fcɣ RIIA_131H;
    (iii) alrededor de 2 µM a Fcɣ RIIA_131R;
    (iv) alrededor de 2 µM a Fcɣ RIIb;

(v) alrededor de 4 μM a Fcɣ RIIIA_158V; y

(vi) mayor de 10 μM a Fcɣ RIIIA_158F.

20. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en donde la afinidad de fijación se determina por resonancia de plasmones superficial a 25 °C.

21. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-20, en donde el anticuerpo no se fija a C1q.

22. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde la fijación a C1q se determina mediante ELISA.

23. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-22, en donde el anticuerpo es un IgG4P.

24. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende una cadena pesada (HC) y una cadena liviana (LC), en donde la secuencia de aminoácidos de la HC está dada por SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la LC está dada por SEQ ID NO: 10.

25. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es glutamina y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 es glicina.

26. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es ácido piroglutámico y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 es glicina.

27. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es glutamina y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 está ausente.

28. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 24, en donde Xaa en la posición 1 de SEQ ID NO: 9 es ácido piroglutámico y Xaa en la posición 446 de SEQ ID NO: 9 está ausente.

29. Un anticuerpo agonista contra CD200R, en donde el anticuerpo no causa una liberación significativa de citocinas en comparación con un anticuerpo IgG1 de tipo silvestre que tiene las mismas CDR que el anticuerpo agonista contra CD200R.

30. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 29, que comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena liviana (LCVR), en donde la HCVR comprende una HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y la LCVR comprende una LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en donde la secuencia de

aminoácidos de la HCDR1 está dada por SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de la HCDR2 está dada por SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos de la HCDR3 está dada por SEQ ID NO: 3, la secuencia de aminoácidos de la LCDR1 está dada por SEQ ID NO: 4, la secuencia de aminoácidos de la LCDR2 está dada por SEQ ID NO: 5, y la secuencia de aminoácidos de la LCDR3 está dada por SEQ ID NO: 6, y en donde la fijación del anticuerpo a Fcɣ RI, Fcɣ RIIA_131H, Fcɣ RIIA_131R, Fcɣ RIIb y Fcɣ RIIIA_158V, Fcɣ RIIIA_158F, o C1q no causa una liberación de citocinas significativa en comparación con un anticuerpo IgG1 de tipo silvestre que tiene los mismos CDR que el anticuerpo agonista contra CD200R.

31. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 29-30, en donde el anticuerpo no se fija a Fcɣ RIIIA_158F o C1q.

32. Un método para tratar a un paciente que tiene una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad alérgica, asma, dermatitis atópica u otros trastornos inflamatorios, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31.

33. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para uso en un tratamiento.

34. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para usar en el tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, dermatitis atópica, asma o un trastorno inflamatorio.

35. El uso del anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, en donde la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad alérgica, asma, dermatitis atópica u otros trastornos inflamatorios.

36. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes aceptables desde el punto de vista farmacéutico.

37. Una molécula de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la HC cuya secuencia de aminoácidos está dada por SEQ ID NO: 9 o un polinucleótido que codifica la LC cuya secuencia de aminoácidos está dada por SEQ ID NO: 10.

38. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 37, en donde la

secuencia del polinucleótido que codifica la HC está dada por SEQ ID NO: 12 o la secuencia del polinucleótido que codifica la LC está dada por SEQ ID NO: 13.

39. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 37 que comprende 1) un polinucleótido que codifica la HC cuya secuencia de aminoácidos está dada por SEQ ID NO: 9, y 2) un polinucleótido que codifica la LC cuya secuencia de aminoácidos está dada por SEQ ID NO: 10.

40. La molécula de ADN de acuerdo con la reivindicación 39, en donde la secuencia del polinucleótido que codifica la HC está dada por SEQ ID NO: 12, y la secuencia del polinucleótido que codifica la LC está dada por SEQ ID NO: 13.

41. Una célula de mamífero transformada con la molécula de ADN de 40, cuya célula de mamífero transformada es capaz de expresar un anticuerpo que comprende dos HC y dos LC, en donde la secuencia de aminoácidos de cada HC está dada por SEQ ID NO: 9, y la secuencia de aminoácidos de cada LC está dada por SEQ ID NO: 10.

RESUMEN

La presente invención se refiere a anticuerpos agonistas anti-CD200R humano, y sus usos para tratar enfermedades tales como dermatitis atópica, urticaria crónica espontánea, alergia, asma, esclerodermia, IBD, SLE, MS, RA, GvHD, o psoriasis.