

PROTEÍNAS DE UNIÓN A IGE Y USOS DE ESTAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio y la prioridad de las solicitudes provisionales estadounidenses n.º 63/526.570, presentada el 13 de julio de 2023 y 63/605.695, presentada el 4 de diciembre de 2023, cuyo contenido completo se incorpora a la presente mediante referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Esta solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato XML y se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad. La copia XML, creada el 11 de julio de 2024, se titula PXS-003WO_SL.xml y tiene un tamaño de 144,5 kilobytes.

ANTECEDENTES

[0003] IgE, desempeña un papel en varias enfermedades y trastornos, como el asma y las enfermedades alérgicas. Por ejemplo, la IgE, cuando se reticula con el antígeno, activa los mastocitos y los basófilos, que luego liberan mediadores alérgicos de la inflamación, como las histaminas y las citocinas. Xolair® (omalizumab) es el único anticuerpo anti-IgE que ha sido aprobado por la FDA hasta la fecha. Si bien este anticuerpo bloquea las reacciones alérgicas dependientes de IgE, Xolair no reduce la concentración sérica de IgE. En cambio, se ha demostrado que este fármaco aumenta las concentraciones séricas de IgE porque el complejo Xolair:IgE tiene una vida media circulante mejorada por el Fc de Xolair. IgE tiene una vida media circulante estimada de aproximadamente 2,5 días, probablemente debido al hecho de que IgE no se une a FcRn, pero el complejo omalizumab:IgE, a través del componente omalizumab, ahora permite que el complejo tenga una vida media más larga que la IgE libre. Ver, por ejemplo, Hu *et al.*, *Clin. Transl. Allergy* 8:27 (2018) y Dodig *et al.*, *Acta. Pharm.* 55:123-138 (2005). En los pacientes que reciben omalizumab, la concentración sérica total de IgE aumenta de 5 a 10 veces debido a este aumento de la semivida del complejo. Si bien el complejo omalizumab:IgE está "inactivo" o no puede unirse a FcεRI cuando el omalizumab se dosifica adecuadamente, los complejos omalizumab:IgE pueden disociarse cuando la cantidad de omalizumab libre es demasiado baja, lo que puede ocurrir con, por ejemplo, una dosis omitida. El omalizumab tiene una K_{apagada} rápida, y gran parte de la IgE se cae del omalizumab en 5 minutos. En pacientes con omalizumab, la gran concentración de complejo omalizumab:IgE puede ser una fuente de

IgE libre y recargar rápidamente los mastocitos. FcεRI es un receptor bien caracterizado, y su sello distintivo es una disociación muy lenta. Se estima que el complejo FcεRI:IgE puede residir en un mastocito durante una semana. Por lo tanto, la retirada de omalizumab puede exacerbar los ya altos niveles patógenos de IgE en pacientes que padecen trastornos alérgicos crónicos.

- 5 Un agente terapéutico que funciona para reducir significativamente los niveles de IgE tiene el potencial de proporcionar un control superior de la enfermedad con un mejor perfil de seguridad. Por lo tanto, existe una necesidad terapéutica de tratamientos mejorados con anticuerpos anti-IgE que reduzcan los niveles séricos de IgE.

COMPENDIO

- 10 **[0004]** La presente descripción se basa, en parte, en la creación de dominios VHH que se unen a IgE y reducen las respuestas inmunitarias mediadas por IgE. La IgE se une a dos receptores principales, el receptor de alta afinidad FcεR1 expresado principalmente en mastocitos y basófilos, que se une al dímero de IgE en una relación molar de 1:1, y un receptor de baja afinidad CD23 expresado principalmente en células B maduras y otros tipos de células, que se une al dímero de IgE en una relación molar de 2:1. Los dominios VHH de la presente descripción bloquean la unión de IgE a FcεR1A, suprimiendo así la señalización mediada por FcεR1A y la activación posterior de mastocitos y basófilos. El dominio VHH, cuando se proporciona en una cantidad de aproximadamente equimolar a en exceso con respecto a IgE, también bloquea la unión de CD23 a IgE.
- 15
- 20 **[0005]** Es importante destacar que los dominios VHH de la presente descripción no se unen o se unen muy mal a un complejo existente de IgE y FcεR1A. Por el contrario, IgE026, otro VHH que se une a IgE soluble y bloquea su unión a FcεRI, también puede unirse a IgE ya unida a FcεRI. Se contempla que un complejo de dímero de IgE y una proteína que contiene VHH bivalente o multivalente (*por ejemplo*, VHH-Fc) podría formar un complejo más grande como resultado de la reticulación. Por ejemplo, un primer dímero de IgE puede unirse a un primer polipéptido de un dímero de VHH-Fc, que utiliza un segundo polipéptido para unirse a una primera subunidad de un segundo dímero de IgE, que a su vez puede reclutar otro VHH-Fc utilizando su segunda subunidad, formando así una cadena lineal de IgE y VHH-Fc alternantes. Es probable que la cadena tenga la propensión a circularizarse a ciertas longitudes dependiendo de la concentración tanto de IgE como de VHH-Fc. Un problema de seguridad significativo puede ocurrir cuando un anticuerpo o proteína de fusión VHH-Fc (bivalente o
- 25
- 30

multivalente) se une al complejo FcεRI:IgE preformado, en el que la IgE es un dímero de dos subunidades. El anticuerpo o la proteína de fusión VHH-Fc puede luego unirse a un complejo FcεRI:IgE adyacente, lo que resulta en un evento de reticulación que podría causar la desgranulación y anafilaxia de mastocitos y/o basófilos. Otro escenario en el que podría ocurrir

5 anafilaxia es cuando el anticuerpo o la proteína de fusión VHH-Fc puede formar un complejo de heterotrímero estable de FcεRI:IgE:anticuerpo o FcεRI:IgE:VHH-Fc. Dado que el anticuerpo o VHH-Fc tiene una región Fc que puede interactuar con los receptores de Fcγ (FcγR), las células vecinas que expresan FcγR pueden interactuar con los heterotrímeros en los basófilos o mastocitos *en trans*, lo que resulta en la activación de los basófilos o mastocitos y anafilaxia.

10 Los dominios VHH de la presente descripción, que no pueden unirse a un complejo de IgE y FcεR1A, no pueden mediar estas formas de reticulación. Como resultado, se espera que estos dominios VHH en formatos bivalentes o multivalentes tengan un perfil de seguridad mejorado.

[0006] También se contempla que los dominios VHH de la presente descripción, cuando están presentes en un formato bivalente o multivalente, pueden reticularse con el dímero de IgE unido

15 a la membrana para formar un complejo más grande. Cuando la construcción de dominio VHH bivalente o multivalente incluye un dominio Fc con una o más mutaciones que mejoran la unión de Fc a FcγRIIB (también conocido como CD32b), CD32b en la superficie de los linfocitos B que expresan IgE se recluta al complejo receptor de linfocitos B, con la porción CDR del VHH-Fc que se une a la IgE unida a la membrana y la porción Fc del VHH-Fc que recluta CD32b al

20 BCR. El reclutamiento de CD32b a BCR da como resultado la inhibición de la señalización del receptor de linfocitos B, porque C32b es un FcγR inhibidor. Esta regulación de retroalimentación negativa puede, a su vez, reducir la producción de IgE de las células B de clase conmutada de IgE solamente. Además, CD32b expresado en células endoteliales sinusoidales hepáticas puede mediar la internalización y degradación de complejos IgE:VHH-Fc, lo que resulta en la

25 eliminación de IgE soluble de la circulación. Los ejemplos de mutaciones de Fc que aumentan la unión a FcγRIIB incluyen S267E y L328F (mutaciones "SELF"), bajo la numeración EU, en una región Fc humana.

[0007] Los dominios VHH y las proteínas que comprenden dichos dominios VHH son útiles para tratar enfermedades y trastornos asociados con IgE, tales como alergia. Son especialmente

30 adecuados para la administración subcutánea. Se sabe que el volumen de administración es a menudo un factor limitante en la vía de administración subcutánea. Dada su mayor solubilidad

en soluciones acuosas y menor peso molecular que los anticuerpos tradicionales, las proteínas VHH-Fc, a la misma concentración, pueden estar a una concentración molar 2 veces mayor que un anticuerpo convencional (el anticuerpo convencional es de aproximadamente 150 kDa, mientras que un VHH-Fc es de aproximadamente 80 kDa). Esta característica, combinada con la capacidad de eliminar rápidamente la IgE de la circulación y reducir la producción de IgE y la baja tasa de disociación para la unión a IgE (*ver, por ejemplo*, los Ejemplos 3 y 13 a continuación), hace que las proteínas VHH-Fc de la presente descripción sean particularmente adecuadas para la administración (*por ejemplo*, por vía subcutánea) a una frecuencia reducida, mejorando así el cumplimiento del paciente. Dado que es fundamental mantener cierta cantidad de fármaco en un paciente para prevenir el desarrollo de IgE circulante detectable, que puede armar un mastocito, el cumplimiento puede ser un componente importante de la eficacia de la terapia anti-IgE.

[0008] De manera relacionada, las proteínas VHH-Fc de la presente descripción pueden reducir el costo de atención médica, dada su frecuencia de dosificación potencialmente más baja. Además, en comparación con los anticuerpos tradicionales que incluyen una cadena pesada y una cadena ligera, las proteínas VHH-Fc no incluyen dos o más secuencias polipeptídicas diferentes. Esto permite una fabricación más fácil y económica de proteínas VHH-Fc a gran escala debido a la mayor producción de títulos en líneas celulares de producción convencionales.

[0009] Por consiguiente, en la presente se proporcionan dominios VHH, polipéptidos, proteínas y métodos de unión a IgE para usar dominios VHH, polipéptidos y proteínas de unión a IgE para tratamientos médicos. Por ejemplo, los dominios VHH, polipéptidos y proteínas descritos en la presente son útiles para reducir los niveles de IgE (de modo que los mastocitos ya no tengan IgE en su superficie) y/o para tratar alergias tales como alergias alimentarias, alergias ambientales, alergias al veneno y/o alergias a animales de compañía. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH. A continuación se proporcionan algunas modalidades.

[0010] En un aspecto, la presente descripción proporciona un dominio VHH que se une a IgE (por ejemplo, IgE humana), que comprende una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1), una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) y una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) de un VHH que comprende las secuencias de

aminoácidos de la SEQ ID NO: 119. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una CDR1, una CDR2 y una CDR3 de un VHH que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47.

5 **[0011]** En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 58; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, bajo la definición de AbM. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, 4, 49, 50 o 102; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la
10 SEQ ID NO: 51, 5, 52, 53 o 103. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 51. En algunas modalidades, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 102, y la
15 CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 103.

[0012] En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 64, bajo la definición de Chothia. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la
20 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 54, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 71.

[0013] En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65, según la definición de Kabat. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la
25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 68, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 72.

30 **[0014]** En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 61; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, bajo la definición de Contacto. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 73.

[0015] En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57; la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62; y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 67, bajo la definición de IMGT. En algunas modalidades del aspecto anterior, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, la CDR2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 70, y la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 74.

[0016] En un aspecto, la presente descripción proporciona un dominio VHH que se une a IgE, que comprende un paratopo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los aminoácidos 26, 27, 32, 99, 100, 105, 106 y 110 de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, el paratopo comprende los aminoácidos 26, 27, 32, 99, 100, 105, 106 y 110 de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, el paratopo comprende además los aminoácidos 29, 35, 52, 97, 98, 103, 107, 111 y 112 de la SEQ ID NO: 42.

[0017] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un dominio VHH que se une a IgE, que comprende una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 115 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 116. Se entiende que aunque el dominio VHH también puede comprender una CDR2, no es necesario especificar la secuencia de la CDR2 dado que tiene una interacción mínima o nula con IgE. En algunas modalidades, la CDR1 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 114. En algunas modalidades, la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118. En algunas modalidades, la CDR3 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 117.

[0018] En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos anteriores, el dominio VHH comprende glutamato (E), aspartato (D), lisina (K) o arginina (R) en la posición 11 de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende glutamato (E), arginina (R) o aspartato (D) en la posición 112 de acuerdo con la numeración de Kabat. En

algunas modalidades, el dominio VHH comprende leucina (L) en la posición 108 de acuerdo con la numeración de Kabat.

[0019] En algunas modalidades, el dominio VHH está humanizado.

[0020] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47.

[0021] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2, 6-46 y 101. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 6-46 y 101.

[0022] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

[0023] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 101. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 101.

[0024] En algunas modalidades, el dominio VHH se une a IgE humana. En algunas modalidades, la IgE humana comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

[0025] En algunas modalidades, el dominio VHH inhibe la unión de IgE a FcεRIA. En algunas modalidades, el dominio VHH no se une a un complejo de IgE humana y FcεRIA.

[0026] En algunas modalidades, el dominio VHH no se une a IgE de mono cynomolgus. En algunas modalidades, el dominio VHH no se une a IgA, IgM o IgG2.

[0027] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende un primer dominio VHH descrito en la presente. En algunas modalidades, el polipéptido comprende, además, un segundo dominio VHH descrito en la presente. En algunas modalidades, el polipéptido comprende, además, un tercer dominio VHH descrito en la presente. En algunas modalidades, los dominios VHH en el polipéptido comprenden las mismas secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3. En algunas modalidades, los dominios VHH en el polipéptido comprenden la misma secuencia de aminoácidos de VHH. En algunas

modalidades, el polipéptido comprende un único dominio VHH.

[0028] En algunas modalidades, el polipéptido comprende además una región Fc, tal como una región Fc de IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más sustituciones que se seleccionan de G236D, S267E y L328F, numeradas de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. En algunas modalidades, la región Fc comprende las sustituciones S267E y L328F, numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas modalidades, la región Fc comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79, 75, 76, 80, 81 u 82.

[0029] En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos aplicables anteriores, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86, 85, 92 o 93.

[0030] En algunas modalidades de cualquiera de los aspectos aplicables anteriores, el polipéptido consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86, 85, 92 o 93.

[0031] La presente descripción también proporciona una proteína que comprende dos o más polipéptidos descritos en la presente que forman un dímero en condiciones fisiológicas. En algunas modalidades, el dímero es un homodímero, que consta opcionalmente de dos polipéptidos.

[0032] En algunas modalidades, el polipéptido o proteína inhibe la unión de IgE a FCER1A. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína no se une a un complejo IgE:FCER1A.

[0033] En algunas modalidades, el polipéptido o proteína reduce la producción de IgE en la sangre de un sujeto en mayor medida que un anticuerpo de isotipo. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína inhibe la desgranulación de mastocitos o basófilos en mayor medida que un anticuerpo de isotipo. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína inhibe la activación de mastocitos o basófilos en mayor medida que un anticuerpo de isotipo. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína no induce la activación de mastocitos o basófilos independiente de antígeno.

[0034] En algunas modalidades, en donde el polipéptido o proteína se une a IgE con una KD inferior o igual a aproximadamente 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM o 1 nM, medida mediante ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR). En algunas modalidades, la KD se mide usando un polipéptido o proteína que incluye dos copias del dominio VHH (por ejemplo, un dímero de polipéptidos VHH-Fc) y un dímero de IgE humana natural.

[0035] La presente descripción también proporciona un inmunoconjugado que comprende un

polipéptido o proteína descrito en la presente.

[0036] La presente descripción también proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido descrito en la presente o un inmunoconjugado descrito en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 **[0037]** Además, la presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido descrito en la presente, un vector que comprende el ácido nucleico, una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico o el vector y una célula hospedadora que expresa el polipéptido o proteína.

- 10 **[0038]** La presente descripción también proporciona un método para producir un polipéptido o proteína descrito en la presente, que comprende incubar la célula hospedadora en condiciones para la expresión del polipéptido o proteína. El método puede comprender, además, aislar el polipéptido o proteína.

- 15 **[0039]** Otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para reducir los niveles de IgE en un sujeto, donde el método comprende administrarle a un sujeto que lo necesite un polipéptido, una proteína, un inmunoconjugado animal o una composición farmacéutica descrita en la presente.

- 20 **[0040]** Otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para tratar una alergia, el método comprende administrarle a un sujeto que lo necesite un polipéptido, proteína, un inmunoconjugado o una composición farmacéutica descrita en la presente. El sujeto puede tener una alergia alimentaria, una alergia ambiental, una alergia a animales de compañía y/o una alergia al veneno.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 25 **[0041]** Las Figuras 1A-1G muestran la intensidad de fluorescencia media de IgE-B10 anti-humana parental y variantes humanizadas de esta formateadas como fusiones VHH-hIgG1 monoméricas que se unen a células 293 que expresan IgE humana como se determina mediante la unión de un anticuerpo secundario específico del fragmento Fc γ de IgG anti-humana conjugado con Alexa Fluor® 647 usando citometría de flujo. Se proporcionan los valores de B $_{\text{máx}}$ y K $_{\text{d}}$ para cada curva.

- 30 **[0042]** Las Figuras 2A-2B muestran un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de VHH B10 original (SEQ ID NO: 2) con variantes humanizadas (SEQ ID NO: 6-46) y la secuencia de

línea germinal de cadena pesada humana "VH3-23" (SEQ ID NO: 94). Los residuos idénticos a B10 se indican con un punto, y se muestran los residuos que difieren. Las CDR (definición de AbM) están en negrita y subrayadas.

[0043] Las Figuras 3A-3K muestran la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados a IgE de varias especies y otros isotipos de inmunoglobulina humana, mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 2. Las Figuras 3A y 3C muestran la unión a IgE humana, la Figura 3B muestra la unión a IgE de mono cinomolgo, la Figura 3D muestra la unión a IgA humana, la Figura 3E muestra la unión a IgG2 humana, la Figura 3F muestra la unión a IgM humana, la Figura 3G muestra la unión a IgE de ratón, la Figura 3H muestra la unión a IgE de rata, la Figura 3I muestra la unión a IgD humana, la Figura La Figura 3J muestra la unión a IgE de cerdo, y la Figura 3K muestra la unión a IgE de perro.

[0044] Las Figuras 4A-4C muestran las curvas de inhibición determinadas por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) para los anticuerpos anti-IgE indicados que bloquean la unión de IgE a FCER1A inmovilizado como se describe en el Ejemplo 3.

[0045] Las Figuras 5A-5C muestran los sensogramas de la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados, inyectados a 1000 nM (Figura 5A), 100 nM (Figura 5B) y 10 nM (Figura 5C), a IgE humana precomplejada a FCER1A inmovilizado como se describe en el Ejemplo 3.

[0046] Las Figuras 6A y 6C muestran las curvas de unión de los anticuerpos anti-IgE indicados que se unen a IgE humana; Las Figuras 6B y 6D muestran las curvas de inhibición de los anticuerpos indicados que bloquean la unión de IgE a FCER1A; La Figura 6E muestra curvas de inhibición de los anticuerpos indicados que bloquean la unión de IgE a FCER2 mediante ELISA como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 6F muestra las curvas de unión de hzB10v40-SELF y hzB10v40,52-SELF a IgE humana. La Figura 6G muestra las curvas de inhibición de hzB10v40-SELF y hzB10v40,52-SELF para bloquear la unión de IgE a FCER1A.

[0047] La Figura 7A muestra la mediana de las curvas de inhibición de la intensidad de fluorescencia de los anticuerpos indicados que bloquean la unión de IgE a FCER1A en la superficie de los mastocitos humanos, y la Figura 7B muestra la mediana de las curvas de unión de intensidad de fluorescencia de los anticuerpos indicados que se unen a IgE humana precomplejada con FCER1A en la superficie de mastocitos humanos determinada mediante citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 5.

[0048] La Figura 8A muestra la inhibición de la activación de mastocitos por los anticuerpos anti-

IgE indicados, y la Figura 8B muestra la activación independiente del antígeno de los mastocitos por los anticuerpos anti-IgE indicados usando citometría de flujo para medir la expresión de CD63 (graficada como % de mastocitos CD63+) como se describe en el Ejemplo 6.

[0049] Las Figuras 9A-9C muestran las curvas de inhibición determinadas por Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) para los anticuerpos anti-IgE indicados que bloquean la unión de IgE a FCER1A inmovilizado como se describe en el Ejemplo 7.

[0050] Las Figuras 10A-10C muestran la activación independiente de antígeno por los anticuerpos anti-IgE indicados a 250 nM (Figura 10A), 1 μ M (Figura 10B) o 3 μ M (Figura 10C), en una prueba de activación de basófilos (BAT) usando citometría de flujo para medir la expresión de CD63 (graficada como % de basófilos CD63+) de sangre completa de 12 donantes, como se describe en el Ejemplo 8. Las Figuras 10D-10G muestran histogramas de expresión de CD63 en un ensayo de BAT usando sangre completa de cuatro donantes adicionales, como se describe en el Ejemplo 8.

[0051] Las Figuras 11A-11D muestran la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados al complejo FceR1A:IgE por valores de respuesta a lo largo del tiempo (segundos, s) según lo determinado por resonancia de plasmones superficiales (SPR). La unión de cada anticuerpo se evaluó usando concentraciones de analito de 5000 nM (Figura 11A), 1000 nM (Figura 11B), 100 nM (Figura 11C) y 10 nM (Figura 11D).

[0052] Las Figuras 12A-12C muestran la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados inyectados sobre chips SPR conjugados con los complejos anticuerpo-IgE indicados. Se grafica la respuesta a lo largo del tiempo (segundos, s). Los analitos de anticuerpo inyectados sobre el chip se analizaron utilizando concentraciones de analito que varían de 5000 nM a 1 nM.

[0053] Las Figuras 13A y 13B muestran la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados inyectados sobre chips SPR conjugados con los complejos anticuerpo-IgE indicados. Se grafica la respuesta a lo largo del tiempo (segundos, s). Los analitos de anticuerpo inyectados sobre el chip se analizaron utilizando concentraciones de analito que varían de 5000 nM a 1 nM.

[0054] Las Figuras 14A y 14B muestran la unión de los anticuerpos anti-IgE indicados inyectados sobre chips SPR conjugados con los complejos anticuerpo-IgE indicados. Se grafica la respuesta a lo largo del tiempo (segundos, s). Los analitos de anticuerpo inyectados sobre el chip se analizaron utilizando concentraciones de analito que varían de 5000 nM a 1 nM.

[0055] Las Figuras 15A-15D muestran estructuras cristalinas de FceR1A (Figura 15A), 8D6

(Figura 15B), Ligelizumab (Figura 15C) u Omalizumab (Figura 15D) en complejo con los dominios de IgE C ϵ indicados. El sitio de unión probable del anticuerpo B10 se indica mediante una flecha en la Figura 15B.

[0056] Las Figuras 16A-16C muestran mapas de calor de valores de OD determinados por ELISA para variantes de VHH hzB10v40 mutagenizadas aleatoriamente individualmente en CDR1 (SEQ ID NO: 3; La Figura 16A), CDR2 (SEQ ID NO: 68; La Figura 16B) y CDR3 (SEQ ID NO: 74; La Figura 16C) para unirse a placas ELISA recubiertas con IgE. Para cada sitio de residuo se analizaron al menos 96 clones. Cada rectángulo representa un clon individual probado y contiene un valor OD. Los rectángulos se colorean por afinidad de unión relativa como se indica por la escala de inserción. La numeración del sitio para cada residuo probado se indica mediante la tabla de inserción. Las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida completa de la unión se indican con "*", las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida casi completa de la unión se indican con "^", y las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida parcial de la unión se indican con "!". Las Figuras 16D y 16E son tablas que muestran mutaciones específicas en CDR1 y CDR3, respectivamente, en hzB10v40 que retuvieron la unión a IgE.

[0057] La Figura 17A muestra las curvas de unión de los anticuerpos anti-IgE indicados que se unen a la IgE humana complejada con Fc ϵ R2 en la superficie de las células RPMI 8866, tal como se evaluó mediante citometría de flujo. Los valores de B $_{\text{máx}}$ y K $_d$ para los anticuerpos anti-IgE indicados se muestran debajo de la gráfica. La Figura 17B muestra curvas de unión de 5 nM de IgE, cuando se precompleja con los anticuerpos anti-IgE indicados, a CD23 en la superficie de células RPMI 8866, según se evaluó mediante citometría de flujo.

[0058] La Figura 18 muestra la inhibición de la producción de IgE por cx13054, cx13055 y omalizumab a tres concentraciones (10 nM, 1 nM y 0,1 nM) en PBMC humanas cultivadas como se describe en el Ejemplo 13. La producción de IgE también se midió sin tratamiento con anticuerpos o sin estimulación como controles.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0059] Las modalidades proporcionadas en la presente se refieren a polipéptidos de unión a IgE y su uso en diversos métodos para tratar enfermedades o trastornos relacionados con IgE, tales como alergias mediadas por IgE.

Definiciones y diversas modalidades

[0060] Los títulos de las secciones que se usan en la presente tienen únicamente fines de organización y no se ha de interpretar que limiten la materia descrita.

[0061] Todas las referencias citadas en la presente, incluidas las solicitudes de patente, las publicaciones de patente y los números de acceso de GenBank se incorporan a la presente mediante referencia, como si cada referencia individual se indicara de forma específica e individual para incorporarse mediante referencia en su totalidad.

[0062] Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en la presente generalmente se entienden bien y se emplean comúnmente utilizando metodología convencional por parte de los expertos en la técnica, tal como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, Molecular cloning: A Laboratory Manual 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, *et al. eds.*, (2003)); la serie METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor *eds.* (1995)), Harlow y Lane, *eds.* (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL y ANIMAL CELL CULTURE (R. I. Freshney, *ed.* (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, *ed.*, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Biología celular: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, *ed.*, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney), *ed.*, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, *eds.*, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, *eds.*); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, *eds.*, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, *eds.*, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan *et al.*, *eds.*, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley y Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Anticuerpos (P. Finch, 1997); Anticuerpos: A Practical Approach (D. Catty., *ed.*, IRL Press, 1988-1989); Anticuerpos monoclonales: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, *eds.*, Oxford University Press, 2000); Uso de anticuerpos: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, *eds.*, Harwood Academic Publishers, 1995); y cáncer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita *et al.*, *eds.*, J.B. Lippincott Company, 1993); y versiones actualizadas de estos.

[0063] A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos que se usan en relación con la presente descripción tendrán los significados que normalmente entienden los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario o se indique expresamente, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Para cualquier conflicto en las definiciones entre diversas fuentes o referencias, prevalecerá la definición proporcionada en el presente documento.

[0064] En general, la numeración de los residuos en las regiones variables de una inmunoglobulina es la del sistema de entumecimiento de Kabat, mientras que la numeración de los residuos en las regiones constantes de una inmunoglobulina es la del índice EU, ambos esquemas de numeración se proporcionan en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). El “índice UE como en Kabat” se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 UE.

[0065] Se entiende que las modalidades de la invención descritas en la presente incluyen modalidades “que comprenden”, “que constan de” y/o “que constan esencialmente de”. Tal como se usa en la presente, la forma singular “un”, “una” y “el/la” incluye referencias plurales a menos que se indique lo contrario. El uso del término “o” en la presente no pretende implicar que las alternativas sean mutuamente excluyentes.

[0066] En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o” a menos que un experto en la técnica lo indique o entienda expresamente. En el contexto de una reivindicación dependiente múltiple, el uso de “o” se refiere a más de una reivindicación independiente o dependiente anterior.

[0067] La frase “muestra de referencia”, “célula de referencia” o “tejido de referencia” denota una muestra con al menos una característica conocida que se puede utilizar como comparación con una muestra con al menos una característica desconocida. En algunas modalidades, una muestra de referencia se puede utilizar como un indicador positivo o negativo. Se puede usar una muestra de referencia para establecer un nivel de proteína y/o ARNm que está presente en, por ejemplo, tejido sano, en contraste con un nivel de proteína y/o ARNm presente en la muestra con características desconocidas. En algunas modalidades, la muestra de referencia proviene del mismo sujeto, pero proviene de una parte diferente del sujeto que la que se está analizando. En algunas modalidades, la muestra de referencia es de un área de tejido que rodea o es adyacente al cáncer. En algunas modalidades, la muestra de referencia no es del sujeto

que se analiza, sino que es una muestra de un sujeto que se sabe que tiene, o no tiene, un trastorno en cuestión (por ejemplo, un trastorno relacionado con IgE). En algunas modalidades, la muestra de referencia es del mismo sujeto, pero desde un punto en el tiempo antes de que el sujeto desarrollara el trastorno. En algunas modalidades, la muestra de referencia es del mismo sujeto o de un sujeto diferente. Cuando se utiliza una muestra de referencia negativa para la comparación, el nivel de expresión o cantidad de la molécula en cuestión en la muestra de referencia negativa indicará un nivel en el que un experto en la técnica apreciará, dada la presente descripción, que no hay y/o un nivel bajo de la molécula. Cuando se utiliza una muestra de referencia positiva para la comparación, el nivel de expresión o cantidad de la molécula en cuestión en la muestra de referencia positiva indicará un nivel en el que un experto en la técnica apreciará, dada la presente descripción, que existe un nivel de la molécula.

[0068] Los términos “beneficio”, “beneficio clínico”, “capacidad de respuesta” y “capacidad de respuesta terapéutica”, tal como se usan en la presente en el contexto de beneficiarse de o responder a la administración de un agente terapéutico, se pueden medir evaluando varios criterios de valoración, *por ejemplo*, inhibición, en cierta medida, de la progresión de la enfermedad, incluida la ralentización y la detención completa; reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; reducción en el tamaño de la lesión; inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células de la enfermedad en órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la propagación de la enfermedad; alivio, en cierta medida, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; aumento en la duración de la presentación libre de enfermedad después del tratamiento, por ejemplo, supervivencia libre de progresión; aumento de la supervivencia general; mayor índice de respuesta; y/o disminución de la mortalidad en un momento dado después del tratamiento. Un sujeto o cáncer que “no responde” o “no responde” es aquel que no cumple con los requisitos mencionados anteriormente para ser “sensible”.

[0069] Los términos “molécula de ácido nucleico”, “ácido nucleico” y “polinucleótido” se pueden utilizar indistintamente y se refieren a un polímero de nucleótidos. Dichos polímeros de nucleótidos pueden contener nucleótidos naturales y/o no naturales e incluyen, de modo no taxativo, ADN, ARN y PNA. “Secuencia de ácido nucleico” se refiere a la secuencia lineal de nucleótidos comprendida en la molécula de ácido nucleico o polinucleótido.

[0070] El término “polipéptido” se refiere a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limita a una longitud mínima. Dichos polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales e incluyen, de modo no taxativo, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. La definición abarca tanto polipéptidos de longitud completa como fragmentos de estos. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente descripción, un “polipéptido” puede incluir modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), en la secuencia natural, siempre que mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR.

[0071] El término “proteína” hace referencia a una macromolécula que comprende uno o más polipéptidos. Por ejemplo, una proteína puede ser un multímero (*por ejemplo*, dímero, trímero o tetramero) formado por una pluralidad de polipéptidos iguales o diferentes.

[0072] “IgE”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier IgE madura nativa que resulta del procesamiento de un precursor de IgE en una célula. El término incluye IgE de cualquier fuente de mamífero, que incluye primates (*por ejemplo*, humanos y monos cynomolgus o rhesus) y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. Se muestra una secuencia de aminoácidos de región constante de IgE humana de ejemplo no taxativo, *por ejemplo*, en el n.º de acceso de GenBank AAB59424,1. Ver SEQ ID NO. 1.

[0073] “FCER1A”, tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier fragmento Fc nativo del receptor la de IgE que se une a IgE. El término incluye FCER1A de cualquier fuente de mamífero, que incluye primates (*por ejemplo*, humanos y monos cynomolgus o rhesus) y roedores (*por ejemplo*, ratones y ratas), a menos que se indique lo contrario. Se muestra una secuencia de aminoácidos precursora de FCER1A humana de ejemplo no taxativo, *por ejemplo*, en el n.º de acceso de GenBank NP_001374209,1. Ver SEQ ID NO. 90.

[0074] El término “se une específicamente” a un antígeno o epítipo es un término que se entiende bien en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica también son bien conocidos en la técnica. Se dice que una molécula presente “unión específica” o “unión preferencial” si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor

duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que lo que hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo de dominio único (sdAb) o polipéptido que contiene VHH “se une específicamente” o “se une preferencialmente” a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración respecto a su unión a otras sustancias. Por ejemplo, un polipéptido que contiene sdAb o VHH que se une específica o preferencialmente a un epítipo de IgE es un polipéptido que contiene sdAb o VHH que se une a este epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítipos de IgE o epítipos no IgE. También se entiende al leer esta definición que; por ejemplo, un polipéptido que contiene sdAb o VHH que se une específica o preferencialmente a una primera diana puede o no unirse específica o preferencialmente a una segunda diana. Como tal, “unión específica” o “unión preferencial” no requiere necesariamente (aunque puede incluir) unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferencial. “Especificidad” se refiere a la capacidad de una proteína de unión para unirse selectivamente a un antígeno.

15 **[0075]** Los términos “inhibición” o “inhibir” se refieren a una disminución, cese o supresión de cualquier característica fenotípica o a la disminución, cese o supresión en la incidencia, grado o probabilidad de esa característica. “Reducir” o “inhibir” es disminuir, reducir, suprimir o detener una actividad, función, cantidad, abundancia o tasa de aumento en comparación con una referencia. En algunas modalidades, por “reducir” o “inhibir” se entiende la capacidad de provocar una disminución general del 10 % o más. En algunas modalidades, por “reducir” o “inhibir” se entiende la capacidad de provocar una disminución general del 50 % o más. En algunas modalidades, por “reducir” o “inhibir” se entiende la capacidad de causar una disminución general de 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. En algunas modalidades, la cantidad indicada anteriormente se inhibe o disminuye durante un período de tiempo, con respecto a un control durante el mismo período de tiempo. Se entiende que una inhibición de la tasa de aumento de IgE se refiere a una disminución en la tasa de aumento del nivel de IgE con o sin una disminución concurrente en los niveles absolutos de IgE. Una inhibición de la actividad de IgE se refiere a una disminución en una actividad de IgE, como la activación de mastocitos y basófilos y la activación y diferenciación de linfocitos B. En algunas modalidades, “inhibir” se refiere a una disminución en una actividad de IgE en comparación con la actividad de IgE en ausencia del modulador. Una inhibición del nivel de IgE incluye la disminución de los niveles de

IgE, tal como la disminución de los niveles de IgE en suero y/o la disminución de la expresión de IgE.

[0076] Tal como se usa en la presente, el término “epítopo” se refiere a un sitio en una molécula diana (por ejemplo, un antígeno, tal como una proteína, ácido nucleico, carbohidrato o lípido) al que se une una molécula de unión al antígeno (por ejemplo, un sdAb o polipéptido que contiene VHH). Los epítopos a menudo incluyen una agrupación de moléculas de superficie químicamente activas, como aminoácidos, polipéptidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítopos se pueden formar a partir de residuos contiguos y/o yuxtapuestos no contiguos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, resto lipídico) de la molécula diana. Los epítopos formados a partir de residuos contiguos (por ejemplo, aminoácidos, nucleótidos, azúcares, resto lipídico) típicamente se retienen en la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo puede incluir, de modo no taxativo, al menos 3, al menos 5 u 8-10 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos). En algunas modalidades, un epítopo tiene menos de 20 residuos (por ejemplo, aminoácidos o nucleótidos) de longitud, menos de 15 residuos o menos de 12 residuos. Dos anticuerpos pueden unirse al mismo epítopo dentro de un antígeno si exhiben unión competitiva para el antígeno. En algunas modalidades, un epítopo se puede identificar por una cierta distancia mínima a un residuo de CDR en la molécula de unión al antígeno. En algunas modalidades, un epítopo se puede identificar por la distancia anterior y limitarse adicionalmente a los residuos involucrados en un enlace (por ejemplo, un enlace de hidrógeno) entre un residuo de la molécula de unión al antígeno y un residuo de antígeno. Un epítopo también se puede identificar mediante diversos escaneos, por ejemplo, un escaneo de alanina o arginina puede indicar uno o más residuos con los que la molécula de unión al antígeno puede interactuar. A menos que se indique explícitamente, un conjunto de residuos como un epítopo no excluye que otros residuos sean parte del epítopo para una molécula de unión al antígeno particular. Más bien, la presencia de dicho conjunto designa una serie mínima (o conjunto de especies) de epítopos. Por lo tanto, en algunas modalidades, un conjunto de residuos identificados como un epítopo designa un epítopo mínimo de relevancia para el antígeno, en lugar de una lista exclusiva de residuos para un epítopo en un antígeno.

[0077] Un “epítopo no lineal” o “epítopo conformacional” comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares no contiguos dentro de la proteína antigénica a la que se une una molécula de unión al antígeno específica para el epítopo. En algunas modalidades, al menos uno de los residuos no será contiguo con los otros residuos observados del epítopo; sin embargo, uno o más de los residuos también pueden ser contiguos con los otros residuos.

[0078] Un “epítopo lineal” comprende polipéptidos, aminoácidos y/o azúcares contiguos dentro de la proteína antigénica a los que se une una molécula de unión al antígeno específica para el epítopo. Se observa que, en algunas modalidades, no es necesario que cada uno de los residuos dentro del epítopo lineal esté unido directamente (o involucrado en un enlace) por la molécula de unión al antígeno. En algunas modalidades, los epítopos lineales pueden ser de inmunizaciones con un péptido que consistía efectivamente en la secuencia del epítopo lineal, o de secciones estructurales de una proteína que están relativamente aisladas del resto de la proteína (de modo que la molécula de unión al antígeno puede interactuar, al menos principalmente), solo con esa sección de secuencia.

[0079] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y comprende diversos polipéptidos que comprenden dominios de unión al antígeno similares a anticuerpos, que incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos convencionales (que comprenden típicamente al menos una cadena pesada y al menos una cadena ligera), anticuerpos de un solo dominio (sdAb, que comprenden al menos un dominio VHH y opcionalmente una región Fc), polipéptidos que contienen VHH (polipéptidos que comprenden al menos un dominio VHH) y fragmentos de cualquiera de los anteriores, siempre y cuando exhiban la actividad de unión al antígeno deseada. En algunas modalidades, un anticuerpo comprende un dominio de dimerización. Dichos dominios de dimerización incluyen, de modo no taxativo, dominio constante de cadena pesada CH1, que típicamente se empareja con un dominio constante de cadena ligera, CL, para formar un heterodímero y regiones Fc (que comprenden bisagra, CH2 y CH3, donde la bisagra y/o CH3 median la dimerización).

[0080] El término anticuerpo también incluye, de modo no taxativo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos de diversas especies tales como camélidos (incluyendo llamas), tiburones, ratones, humanos, monos cynomolgus, etc.

[0081] El término “dominio de unión al antígeno” tal como se usa en la presente se refiere a una parte de un anticuerpo suficiente para unirse al antígeno. En algunas modalidades, un dominio

de unión al antígeno de un anticuerpo convencional comprende tres CDR de cadena pesada y tres CDR de cadena ligera. Por lo tanto, en algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno comprende una región variable de cadena pesada que comprende CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, y cualquier parte de FR1 y/o FR4 necesaria para mantener la unión al antígeno, y una región variable de cadena ligera que comprende CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, y cualquier parte de FR1 y/o FR4 necesaria para mantener la unión al antígeno. En algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno de un sdAb o polipéptido que contiene VHH comprende tres CDR de un dominio VHH. Por lo tanto, en algunas modalidades, un dominio de unión al antígeno de un sdAb o polipéptido que contiene VHH comprende un dominio VHH que comprende CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3, y cualquier porción de FR1 y/o FR4 requerida para mantener la unión al antígeno.

[0082] El término “VHH” o “dominio VHH” o “dominio de unión al antígeno VHH”, tal como se usa en la presente, se refiere a la porción de unión al antígeno (*por ejemplo*, una o más de las CDR) de un anticuerpo de dominio único, tal como un anticuerpo de camélido. En algunas modalidades, un VHH comprende tres CDR y cuatro regiones marco, designadas FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En algunas modalidades, un VHH puede truncarse en el extremo N o el extremo C de modo que comprenda solo una FR1 y/o FR4 parcial, o carezca de una o ambas de esas regiones marco, siempre que el VHH mantenga sustancialmente la unión y especificidad del antígeno.

[0083] Los términos “anticuerpo de dominio único” y “sdAb” se utilizan indistintamente en la presente para referirse a un anticuerpo que comprende al menos un dominio monomérico, tal como un dominio VHH, o un dominio VNAR (de un anticuerpo de tiburón) sin una cadena ligera, y una región Fc. En algunas modalidades, un sdAb es un dímero de dos polipéptidos, donde cada polipéptido comprende al menos un dominio VHH y una región Fc. Tal como se usa en la presente, los términos “anticuerpo de dominio único” y “sdAb” abarcan polipéptidos que comprenden múltiples dominios VHH, tal como un polipéptido que tiene la estructura VHH₁-VHH₂-Fc o VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc, en donde VHH₁, VHH₂ y VHH₃ pueden ser iguales o diferentes.

[0084] El término “polipéptido que contiene VHH” se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio VHH. En algunas modalidades, un polipéptido VHH comprende dos, tres o cuatro o más dominios VHH, en donde cada dominio VHH puede ser el mismo o diferente. En

algunas modalidades, un polipéptido que contiene VHH comprende una región Fc. En algunas de dichas modalidades, el polipéptido que contiene VHH puede denominarse sdAb. Además, en algunas de dichas modalidades, el polipéptido de VHH puede formar un dímero. Las estructuras no limitantes de polipéptidos que contienen VHH, que también son sdAb, incluyen

5 VHH₁-Fc, VHH₁-VHH₂-Fc y VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc, en donde VHH₁, VHH₂ y VHH₃ pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades de dichas estructuras, un VHH puede conectarse a otro VHH mediante un enlazador, o un VHH puede conectarse a la región Fc mediante un enlazador. En algunas de estas modalidades, el enlazador comprende 1-20 aminoácidos, preferentemente 1-20 aminoácidos compuestos predominantemente de glicina y,

10 opcionalmente, serina. En algunas modalidades, cuando un polipéptido que contiene VHH comprende un Fc, forma un dímero. Por lo tanto, la estructura VHH₁-VHH₂-Fc, si forma un dímero, se considera tetravalente (es decir, el dímero tiene cuatro dominios VHH). De manera similar, la estructura VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc, si forma un dímero, se considera hexavalente (es decir, el dímero tiene seis dominios VHH). En algunas modalidades, un polipéptido que contiene

15 VHH que comprende una región Fc forma un homodímero, por ejemplo, a través de la asociación de la bisagra de las regiones Fc.

[0085] El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo (que incluye un sdAb o polipéptido que contiene VHH) de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por

20 posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.

25 Por lo tanto, una muestra de anticuerpos monoclonales puede unirse al mismo epítopo en el antígeno. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez

30 por Kohler y Milstein, 1975, Nature 256:495, o pueden prepararse mediante métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.816.567. Los anticuerpos

monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, 1990, Nature 348:552-554, por ejemplo.

[0086] El término "CDR" denota una región determinante de complementariedad como se define por al menos una forma de identificación para un experto en la técnica. En algunas modalidades, las CDR se pueden definir de acuerdo con cualquiera de los esquemas de numeración de Chothia (*ver* Chothia y Lesk, J Mol Biol, 1987, 196:901-917), el esquema de numeración de Kabat (*ver* Kabat *et al.*, 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, DIANE Publishing: 2719), una combinación de Kabat y Chothia, la definición de AbM (véase Whitelegg & Rees, Protein Eng. 2000, 13:819-824; Whitelegg y Rees, Methods Mol Biol. 2004, 248:51-91), la definición de IMGT (*ver* Lefranc, (1999) The Immunologist, 7, 132-136), y/o la definición de contacto (*ver* MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 1996, 262:732-745). Un VHH comprende tres CDR, designadas CDR1, CDR2 y CDR3.

[0087] El término "región constante de cadena pesada" tal como se usa en la presente se refiere a una región que comprende al menos tres dominios constantes de cadena pesada, CH1, bisagra, CH2 y CH3. Por supuesto, las eliminaciones y alteraciones que no alteran la función dentro de los dominios se abarcan dentro del alcance del término "región constante de cadena pesada", a menos que se indique lo contrario. Los ejemplos no taxativos de regiones constantes de cadena pesada incluyen γ , δ y α . Las regiones constantes de cadena pesada ejemplares no taxativas también incluyen ϵ y μ . Cada región constante pesada corresponde a un isotipo de anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo que comprende una región constante γ es un anticuerpo IgG, un anticuerpo que comprende una región constante δ es un anticuerpo IgD, y un anticuerpo que comprende una región constante α es un anticuerpo IgA. Además, un anticuerpo que comprende una región constante μ es un anticuerpo IgM, y un anticuerpo que comprende una región constante ϵ es un anticuerpo IgE. Ciertos isotipos se pueden subdividir en subclases. Por ejemplo, los anticuerpos IgG incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos IgG1 (que comprenden una región constante γ_1), IgG2 (que comprende una región constante γ_2), IgG3 (que comprende una región constante γ_3) e IgG4 (que comprende una región constante γ_4); Los anticuerpos IgA incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos IgA1 (que comprenden una región constante α_1) e IgA2 (que comprenden una región constante α_2); y los anticuerpos IgM incluyen, de modo no taxativo, IgM1 e IgM2.

[0088] Una "región Fc", tal como se usa en la presente, se refiere a una parte de una región

constante de cadena pesada que comprende CH2 y CH3. En algunas modalidades, una región Fc comprende una bisagra, CH2 y CH3. En diversas modalidades, cuando una región Fc comprende una bisagra, la bisagra y/o CH3 median la dimerización entre dos polipéptidos que contienen Fc. Una región Fc puede ser de cualquier isotipo de región constante de cadena pesada de anticuerpo discutido en la presente. En algunas modalidades, una región Fc es una IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En algunas modalidades, la región Fc carece de lisina C-terminal. En algunas modalidades, el aminoácido C-terminal de la región Fc es un aminoácido distinto de lisina.

[0089] Un "marco humano aceptor", como se usa en la presente, es un marco que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco de dominio variable de cadena pesada (V_H) derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco de consenso humano, como se discute en la presente. Un marco humano aceptor derivado de un marco de inmunoglobulina humana o un marco consenso humano puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de este, o puede contener cambios en la secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, la cantidad de cambios de aminoácidos es menor que 10, o menor que 9, o menor que 8, o menor que 7, o menor que 6, o menor que 5, o menor que 4, o menor que 3, en todos los marcos humanos en un único dominio de unión al antígeno, tal como un VHH.

[0090] "Afinidad" se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un sitio de unión simple de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo, tal como un sdAb o polipéptido que contiene VHH) y su compañero de unión (por ejemplo, un antígeno). La afinidad o la afinidad aparente de una molécula X por su compañero Y generalmente se puede representar mediante la constante de disociación (K_d) o la $K_{d\text{-aparente}}$, respectivamente. La afinidad se puede medir mediante métodos comunes conocidos en la técnica (tales como, por ejemplo, ELISA K_d , KinExA, citometría de flujo y/o dispositivos de resonancia de plasmón superficial), que incluyen aquellos descritos en la presente. Dichos métodos incluyen, de modo no taxativo, métodos que involucran BIAcore®, Octet® o citometría de flujo. En algunas modalidades, un polipéptido que contiene VHH se une a IgE con una K_D inferior o igual a aproximadamente 1 nM, 0,8 nM, 0,6 nM, 0,4 nM o 0,2 nM según lo medido por ELISA. En algunas modalidades, un polipéptido que contiene VHH se une a IgE con una K_D inferior o igual a aproximadamente 5 nM, 4 nM, 3 nM, 2 nM, 1,5, 1 nM, 0,8 nM o 0,6 nM, tal como se mide mediante resonancia de plasmón superficial (SPR).

[0091] El término “ K_d ”, tal como se usa en la presente, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción de molécula de unión a antígeno/antígeno. Cuando se usa el término “ K_d ” en la presente, incluye K_d y K_d -aparente.

[0092] En algunas modalidades, la K_d de la molécula de unión al antígeno se mide mediante citometría de flujo usando una línea celular que expresa el antígeno y ajustando la fluorescencia media medida a cada concentración de anticuerpo a una ecuación de unión de un sitio no lineal (Prism Software graphpad). En algunas de estas modalidades, el K_d es K_d -aparente.

[0093] El término “actividad biológica” se refiere a una o más propiedades biológicas de una molécula (ya sea presente de forma natural como se encuentra *in vivo*, o proporcionada o habilitada por medios recombinantes).

[0094] Un anticuerpo “agonista” o “activador” es aquel que aumenta y/o activa una actividad biológica del antígeno diana. En algunas modalidades, el anticuerpo agonista se une a un antígeno y aumenta su actividad biológica en al menos aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % o más.

[0095] Un anticuerpo “antagonista”, “bloqueante” o “neutralizante” es aquel que inhibe una actividad biológica del antígeno diana. En algunas modalidades, un anticuerpo neutralizante se une a un antígeno y reduce su actividad biológica en al menos aproximadamente 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o más.

[0096] Un sdAb o polipéptido que contiene VHH “madurado por afinidad” se refiere a un sdAb o polipéptido que contiene VHH con una o más alteraciones en una o más CDR en comparación con un sdAb o polipéptido que contiene VHH original que no posee dichas alteraciones, dichas alteraciones dan como resultado una mejora en la afinidad del sdAb o polipéptido que contiene VHH por el antígeno.

[0097] Un “VHH humanizado”, tal como se usa en la presente, se refiere a un VHH en el que una o más regiones marco se han reemplazado sustancialmente con regiones marco humanas. En algunos casos, determinados residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, el VHH humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el VHH original ni en las secuencias marco humanas, pero se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento del polipéptido que contiene sdAb VHH. En algunas modalidades, un sdAb humanizado o polipéptido que contiene VHH comprende una región Fc humana. Tal como se apreciará, una

secuencia humanizada puede identificarse por su secuencia primaria y no denota necesariamente el proceso mediante el cual se creó el anticuerpo.

[0098] Una "región Fc positiva para efector" posee una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. Los ejemplos de "funciones efectoras" incluyen la unión al receptor Fc; Unión a Clq y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); Unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de linfocitos B, etc. Dichas funciones efectoras generalmente requieren que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y se pueden evaluar utilizando diversos ensayos.

[0099] Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc que se encuentra en la naturaleza. Las regiones Fc humanas de secuencia natural incluyen una región Fc de IgG1 humana de secuencia natural (alotipos no A y A); región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; región Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa, así como variantes de origen natural de esta.

[00100] Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. En algunas modalidades, una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, pero conserva al menos una función efectora de la región Fc de secuencia natural. En algunas modalidades, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural o con la región Fc de un polipéptido original, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente, de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido original. En algunas modalidades, la región Fc variante en la presente poseerá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido original, al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia con esta, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos

aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % de identidad de secuencia con esta.

[00101] “Receptor de Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. En algunas modalidades, un FcγR es un FcR humano natural. En algunas modalidades, un FcR es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de esos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplasmático. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplasmático. (Ver, por ejemplo, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan, por ejemplo, en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). En la presente, el término “FcR” abarca otros FcR, incluidos los que se identificarán en el futuro. Por ejemplo, el término “receptor Fc” o “FcR” también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y la regulación de la homeostasis de las inmunoglobulinas. Se conocen métodos para medir la unión a FcRn (ver, por ejemplo, Ghetie y Ward, *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie *et al.*, *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton *et al.*).

[00102] El término “sustancialmente similar” o “sustancialmente igual”, tal como se usa en la presente, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos o más valores numéricos de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos o más valores tiene poca o ninguna importancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dicho valor. En algunas modalidades, los dos o más valores sustancialmente similares difieren en no más de aproximadamente uno cualquiera de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 50 %.

[00103] Una “variante” de polipéptido significa un polipéptido biológicamente activo que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia natural después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario,

para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos en los que se agregan o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N o C del polipéptido. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos

5 aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos. En algunas modalidades, una variante tendrá al menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos con el polipéptido de secuencia natural.

[00104] Tal como se usa en el presente documento, “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” y “homología” con respecto a una secuencia de péptidos, polipéptidos o anticuerpos se definen como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de péptidos o polipéptidos, después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar

10 ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros

15 apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

[00105] Una sustitución de aminoácido puede incluir, de modo no taxativo, el reemplazo de un aminoácido en un polipéptido con otro aminoácido. Las sustituciones ilustrativas se representan en la Tabla 1. Las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir en un

20 polipéptido de interés y los productos se seleccionan para una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno retenida/mejorada, inmunogenicidad disminuida o ADCC o CDC mejorada.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

[00106] Los aminoácidos se pueden agrupar de acuerdo con las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobo: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilo neutro: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácido: Asp, Glu;
- (4) básico: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromático: Trp, Tyr, Phe.

10 **[00107]** Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

[00108] El término “vector” se usa para describir un polinucleótido que se puede modificar para que contenga un polinucleótido o polinucleótidos clonados que se pueden propagar en una

célula hospedadora. Un vector puede incluir uno o más de los siguientes elementos: un origen de replicación, una o más secuencias reguladoras (tales como, por ejemplo, promotores y/o potenciadores) que regulan la expresión del polipéptido de interés, y/o uno o más genes marcadores seleccionables (tales como, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos y genes que se pueden utilizar en ensayos colorimétricos, por ejemplo, β -galactosidasa). El término “vector de expresión” hace referencia a un vector que se utiliza para expresar un polipéptido de interés en una célula hospedadora.

[00109] Una “célula hospedadora” se refiere a una célula que puede ser o ha sido receptora de un vector o polinucleótido aislado. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas o células eucariotas. Los ejemplos de células eucariotas incluyen células de mamífero, tales como células animales de primate o no primate; células fúngicas, tales como levadura; células vegetales; y células de insectos. Los ejemplos no taxativos de células de mamífero incluyen, de modo no taxativo, células NSO, células PER.C6® (Crucell) y células 293 y CHO, y sus derivados, tales como células 293-6E, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-S y CHO-DS. Las células hospedadoras incluyen la progenie de una sola célula hospedadora, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en complemento de ADN genómico) a la célula original, original debido a una mutación natural, accidental o deliberada. Una célula hospedadora incluye células transfectadas in vivo con uno o más polinucleótidos proporcionados en la presente.

[00110] El término “aislado”, tal como se usa en la presente, se refiere a una molécula que se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que normalmente se encuentra en la naturaleza o se produce. Por ejemplo, un polipéptido se denomina “aislado” cuando se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo. Cuando una célula secreta un polipéptido después de la expresión, se considera que la separación física del sobrenadante que contiene el polipéptido de la célula que lo produjo está “aislando” el polipéptido. De manera similar, un polinucleótido se denomina “aislado” cuando no es parte del polinucleótido más grande (tal como, por ejemplo, ADN genómico o ADN mitocondrial, en el caso de un polinucleótido de ADN) en el que se encuentra típicamente en la naturaleza, o se separa de al menos algunos de los componentes de la célula en la que se produjo, por ejemplo, en el caso de un polinucleótido de ARN. Por lo tanto, un polinucleótido de ADN que está contenido en un vector dentro de una célula hospedadora puede denominarse “aislado”.

[00111] Los términos “individuo” y “sujeto” se usan indistintamente en la presente para referirse a un animal; por ejemplo, un mamífero. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar mamíferos, que incluyen, de modo no taxativo, humanos, roedores, simios, felinos, caninos, equinos, bovinos, porcinos, ovinos, caprinos, animales de laboratorio de mamíferos, animales de granja de mamíferos, animales deportivos de mamíferos y mascotas de mamíferos. En algunos ejemplos, un “individuo” o “sujeto” se refiere a un individuo o sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad o trastorno. En algunas modalidades, el sujeto que recibe el tratamiento puede ser un paciente, lo que designa el hecho de que se ha identificado que el sujeto tiene un trastorno de relevancia para el tratamiento o tiene un riesgo adecuado de contraer el trastorno.

[00112] Una “enfermedad” o “trastorno”, tal como se usa en la presente, se refiere a una afección en la que se necesita y/o desea tratamiento.

[00113] En algunas modalidades, un “aumento” o “disminución” se refiere a un aumento o disminución estadísticamente significativo, respectivamente. Como será evidente para el experto, “modular” también puede implicar efectuar un cambio (que puede ser un aumento o una disminución) en la afinidad, aidez, especificidad y/o selectividad de una diana o antígeno, para uno o más de sus ligandos, compañeros de unión, compañeros para la asociación en una forma homomultimérica o heteromultimérica, o sustratos; efectuar un cambio (que puede ser un aumento o una disminución) en la sensibilidad del objetivo o antígeno para una o más condiciones en el medio o entorno en el que el objetivo o antígeno está presente (tal como pH, fuerza iónica, presencia de cofactores, *etc.*); y/o la proliferación celular o la producción de citocinas, en comparación con las mismas condiciones pero sin la presencia de un agente de prueba. Esto se puede determinar de cualquier manera adecuada y/o utilizando cualquier ensayo adecuado conocido *per se* o descrito en la presente, dependiendo del objetivo involucrado.

[00114] Tal como se usa en la presente, “una respuesta inmunitaria” pretende abarcar respuestas inmunitarias celulares y/o humorales que son suficientes para inhibir o prevenir el inicio o mejorar los síntomas de la enfermedad (por ejemplo, cáncer o metástasis de cáncer). “Una respuesta inmunitaria” puede abarcar aspectos tanto del sistema inmunitario innato como del adaptativo.

[00115] Tal como se usa en la presente, “tratamiento” es un enfoque para obtener resultados

clínicos beneficiosos o deseados. "Tratamiento", tal como se usa en la presente, cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para la enfermedad en un mamífero, incluido un humano. Para los fines de esta descripción, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, de modo no taxativo, uno o más de: alivio de uno o más síntomas, 5 disminución de la extensión de la enfermedad, prevención de la exacerbación de la enfermedad, prevención o retraso de la recurrencia de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora del estado de la enfermedad, inhibición de la enfermedad o progresión de la enfermedad e inhibición o ralentización de la enfermedad o su progresión. También se abarca por "tratamiento" una reducción de la consecuencia patológica de una enfermedad. Los 10 métodos proporcionados en la presente contemplan uno cualquiera o más de estos aspectos del tratamiento. En línea con lo anterior, el término tratamiento no requiere la eliminación del cien por ciento de todos los aspectos del trastorno.

[00116] "Mejorar" significa una disminución o mejora de uno o más síntomas en comparación con no administrar un agente terapéutico. "Mejorar" también incluye acortar o reducir la duración 15 de un síntoma.

[00117] El término "muestra biológica" significa una cantidad de una sustancia de un ser vivo o de un ser anteriormente vivo. Dichas sustancias incluyen, de modo no taxativo, sangre (por ejemplo, sangre completa), plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, líquido de lavado nasal, orina, líquido amniótico, líquido sinovial, células endoteliales, leucocitos, 20 monocitos, otras células, órganos, tejidos, médula ósea, ganglios linfáticos y bazo.

[00118] El término "control" o "referencia" en el contexto de un experimento o comparación, se refiere a una composición que se sabe que no contiene un analito ("control negativo") o que contiene un analito ("control positivo"). Un control positivo puede comprender una concentración conocida de analito. Un control o referencia también puede hacer referencia a un agente de 25 control que se sabe que carece de la actividad de un agente que se está evaluando, tal como un anticuerpo.

[00119] "Prevenir", tal como se usa en la presente, incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha sido diagnosticado con la enfermedad. A 30 menos que se especifique lo contrario, los términos "reducir", "inhibir" o "prevenir" no denotan ni requieren una prevención completa en todo momento, sino solo durante el período de tiempo

que se mide.

[00120] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula, agonista o antagonista puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de la sustancia/molécula, agonista o antagonista para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista se compensa con los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una cantidad terapéuticamente eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Una cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico y/o profiláctico deseado.

[00121] Los términos "formulación farmacéutica" y "composición farmacéutica" se usan indistintamente y se refieren a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del ingrediente o ingredientes activos sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones pueden ser estériles.

[00122] Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulación, auxiliar de formulación o vehículo sólido, semisólido o líquido no tóxico convencional en la técnica para su uso con un agente terapéutico que juntos comprenden una "composición farmacéutica" para su administración a un sujeto. Un portador farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación. El portador farmacéuticamente aceptable es apropiado para la formulación empleada.

[00123] La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y secuencial en cualquier orden.

[00124] El término "simultáneamente" se usa en la presente para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos, donde al menos parte de la administración se superpone en el tiempo, o donde la administración de un agente terapéutico cae dentro de un corto período de tiempo con respecto a la administración del otro agente terapéutico, o donde los efectos terapéuticos de ambos agentes se superponen durante al menos un período de tiempo.

[00125] El término "secuencialmente" se utiliza en la presente para referirse a la administración de dos o más agentes terapéuticos que no se superponen en el tiempo, o donde

los efectos terapéuticos de los agentes no se superponen.

[00126] Tal como se usa en la presente, “junto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra modalidad de tratamiento. Como tal, “junto con” se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento al individuo.

[00127] El término “prospecto” se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, la combiterapia, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

[00128] Un “artículo de fabricación” es cualquier fabricación (por ejemplo, un paquete o recipiente) o kit que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer), o una sonda para detectar específicamente un biomarcador descrito en la presente. En algunas modalidades, la fabricación o el kit se promueve, distribuye o vende como una unidad para realizar los métodos descritos en la presente.

[00129] Los términos “etiqueta” y “etiqueta detectable” significan un resto unido, por ejemplo, a un anticuerpo o antígeno para hacer detectable una reacción (por ejemplo, unión) entre los miembros del par de unión específica. El miembro etiquetado del par de unión específico se denomina “etiquetado de forma detectable”. Por lo tanto, el término “proteína de unión marcada” se refiere a una proteína con una etiqueta incorporada que proporciona la identificación de la proteína de unión. En algunas modalidades, la etiqueta es un marcador detectable que puede producir una señal que es detectable por medios visuales o instrumentales, por ejemplo, incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que se puede detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, de modo no taxativo, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho o ^{153}Sm); cromógenos, marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínulo; epítomos de polipéptido predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias

de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítipo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. Los ejemplos representativos de marcadores comúnmente empleados para inmunoensayos incluyen restos que producen luz, por ejemplo, compuestos de acridinio, y restos que producen fluorescencia, por ejemplo, fluoresceína. En este sentido, el resto en sí mismo puede no estar marcado de forma detectable, pero puede llegar a ser detectable tras la reacción con otro resto.

Ejemplos de polipéptidos y proteínas de unión a IgE

[00130] Los polipéptidos y proteínas de unión a IgE se proporcionan en la presente. En diversas modalidades, los polipéptidos o proteínas de unión a IgE comprenden al menos un dominio VHH que se une a IgE. En algunas modalidades, la IgE es IgE humana (*por ejemplo*, que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1). En algunas modalidades, un polipéptido o proteína de unión a IgE es específico para IgE y no se une a IgG, IgM o IgA.

[00131] En algunas modalidades, un polipéptido o proteína de unión a IgE bloquea la unión de IgE a FCER1A. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE inhibe la activación, tal como la activación de mastocitos o basófilos. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE inhibe la activación de mastocitos o basófilos en mayor medida que un anticuerpo de isotipo. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE inhibe la desgranulación, tal como la desgranulación de mastocitos o basófilos, por ejemplo, con un IC50 inferior a 5 o 10 nM (*por ejemplo*, 0,1-10 nM, 0,2-10 nM, 0,5-10 nM, 1-10 nM, 0,1-5 nM, 0,2-5 nM, 0,5-5 nM o 1-5 nM). Un método ejemplar para evaluar el impacto en la desgranulación de basófilos se describe en el Ejemplo 8 de la presente.

[00132] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho dominios VHH que se unen a IgE. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende uno, dos, tres o cuatro dominios VHH que se unen a IgE. Los polipéptidos de unión a IgE pueden comprender uno o más dominios VHH que se unen a una o más proteínas diana distintas de IgE. Estos polipéptidos pueden denominarse polipéptidos “multiespecíficos”.

[00133] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH que se une a IgE y un dominio de multimerización. Dichos polipéptidos pueden formar multímeros que incluyen una pluralidad de los dominios VHH. En algunas modalidades,

un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH que se une a IgE y una región Fc (*por ejemplo*, una región Fc de IgG). En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende uno, dos, tres o cuatro dominios VHH y una región Fc. En algunas modalidades, una región Fc media la dimerización del polipéptido de unión a IgE en condiciones fisiológicas de modo que se forma un dímero que duplica la cantidad de sitios de unión a IgE en la proteína. Por ejemplo, un polipéptido de unión a IgE que comprende tres dominios VHH que se unen a IgE y una región Fc es trivalente como un monómero, pero en condiciones fisiológicas, la región Fc puede mediar en la dimerización, para formar una proteína de unión a IgE como un dímero hexavalente en tales condiciones. En diversas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana (*por ejemplo*, una región Fc de IgG1 o IgG4 humana), o se deriva de una región Fc humana. En algunas modalidades, la región Fc carece de lisina C-terminal. En algunas modalidades, el aminoácido C-terminal de la región Fc es un aminoácido distinto de lisina.

[00134] En algunas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc que se une a FcγRIIb (también conocido como CD32b), por ejemplo, tiene una afinidad de unión aumentada a FcγRIIb que una región Fc de IgG1 humana de tipo salvaje. En algunas modalidades, la región Fc comprende una o más de las mutaciones, G236D, S267E y L328F, numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana que comprende las mutaciones "SELF" S267E y L328F. En algunas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana que comprende las mutaciones "DSELF" G236D, S267E y L328F. En algunas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana que comprende las mutaciones "xELL" que eliminan E233, L234 y L235. En algunas de dichas modalidades, la región Fc puede ser un isotipo de IgG1, tal como una IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc es una variante de región Fc de IgG1 humana, tal como cualquier variante de región Fc de IgG1 humana descrita en la presente descripción. En algunas de estas modalidades, la región Fc comprende mutaciones "SELF" (S267E, L328F), como en las SEQ ID NO: 79 y 80. En algunas de estas modalidades, la región Fc comprende mutaciones "DSELF" (G236D, S267E, L328F), como en las SEQ ID NO: 81 y 82. En algunas de estas modalidades, la región Fc comprende mutaciones "xELL" (delección de E233, L234 y L235), como en las SEQ ID NO: 77 y 78. Dichas regiones Fc, cuando se acoplan

a células B productoras de IgE, pueden inhibir la actividad (*por ejemplo*, actividad de producción de IgE) de las células B. Por consiguiente, en algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE reduce la producción de IgE en la sangre de un sujeto en mayor medida que un anticuerpo de isotipo. Por ejemplo, en algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE, a una concentración de 1 nM, reduce la producción de IgE en la sangre de un sujeto en al menos 20%, 30%, 40%, 50% o 60% que un anticuerpo de isotipo. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE, a una concentración de 10 nM, reduce la producción de IgE en la sangre de un sujeto en al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% que un anticuerpo de isotipo. Un método ejemplar para evaluar el impacto en la producción de IgE se describe en el Ejemplo 12 de la presente. En algunas modalidades, un polipéptido o proteína de unión a IgE reduce los niveles de IgE *in vivo*. En algunas de dichas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE no cambia los niveles de IgG, IgM o IgA *in vivo*.

[00135] En algunas modalidades, el dominio VHH no se une a un complejo de IgE humana y FcεRIA. Por consiguiente, un polipéptido o proteína que comprende el dominio VHH (*por ejemplo*, uno que incluye un dominio Fc) no induce la activación de mastocitos o basófilos independiente de antígeno.

[00136] En algunas modalidades, la región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE se deriva de una región Fc humana y comprende mutaciones diseñadas para la heterodimerización.

[00137] Las regiones Fc que se pueden utilizar en un polipéptido de unión a IgE incluyen regiones Fc que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81 o 82.

[00138] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos dos dominios VHH, en donde un primer dominio VHH se une a un primer epítipo de IgE y un segundo dominio VHH se une a un segundo epítipo de IgE. Cuando el polipéptido de unión a IgE comprende un dominio VHH que se une a un primer epítipo de IgE y un dominio VHH que se une a un segundo epítipo de IgE, el polipéptido de unión a IgE puede denominarse “biepitópico”, “biparatópico” o “biespecífico”. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos dos dominios VHH, donde un primer dominio VHH se une a IgE y un segundo dominio VHH se une a un antígeno distinto de IgE. Dichos polipéptidos pueden denominarse “biespecíficos” o “multiespecíficos”.

[00139] En algunas modalidades de los polipéptidos, las porciones adyacentes de un polipéptido de unión a IgE, tal como un primer VHH y un segundo VHH o un VHH y una región Fc, se pueden conectar entre sí mediante un enlazador. En algunas de estas modalidades, el enlazador comprende 1-20, 1-12, 1-8 o 1-4 aminoácidos, preferentemente compuestos predominantemente de glicina y, opcionalmente, serina. Un ejemplo no taxativo de dicho enlazador es GGGG (SEQ ID NO: 91).

Dominios VHH de unión a IgE

[00140] Los dominios VHH de ejemplo no taxativos que se unen a IgE se proporcionan en la Tabla 2A, se muestran las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de AbM. Las secuencias de CDR de acuerdo con la definición de CDR indicada se muestran en la Tabla 2B (consenso) y la Tabla 2C (hzB10v37-hzB10v44). Las secuencias para el VHH indicado se muestran en la Tabla de Determinadas Secuencias de la presente. Un nombre de polipéptido que comienza con “hz” indica que es una versión humanizada del polipéptido parental correspondiente, y un nombre de polipéptido que termina con “con” representa una secuencia de consenso.

Tabla 2A: Se muestran los dominios VHH que se unen a IgE – CDR de acuerdo con la definición de AbM

Nombre del clon	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
B10	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	2
Variantes humanizadas B10							
hzB10v1	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	6
hzB10v2	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	7
hzB10v3	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	8
hzB10v4	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	9
hzB10v5	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	10
hzB10v6	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	11
hzB10v7	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRMLSTYWSDRSWDF	5	12
hzB10v8	GLTFSSYNMG	3	ISGSSSTSTY	49	RRMLSTYWSDRSWDF	5	13

Nombre del clon	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hzB10v9	GLTFSSYNMG	3	VSGSSSTSTY	50	RRMLSTYWSDRSWDF	5	14
hzB10v10	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRLLSTYWSDRSWDF	51	15
hzB10v11	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRILSTYWSDRSWDF	52	16
hzB10v12	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRVLSTYWSDRSWDF	53	17
hzB10v13	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	18
hzB10v14	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	19
hzB10v15	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	20
hzB10v16	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	21
hzB10v17	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	22
hzB10v18	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	23
hzB10v20	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	24
hzB10v21	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	25
hzB10v22	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	26
hzB10v23	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	27
hzB10v24	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	28
hzB10v25	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	29
hzB10v26	GLTFSSYNMG	3	MSGSSSTSTY	4	RRMLSTYWSDRSWDF	5	30
hzB10v27	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	31
hzB10v28	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	32
hzB10v29	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	33
hzB10v30	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	34
hzB10v31	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	35
hzB10v32	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	36
hzB10v33	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	37
hzB10v34	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	38
hzB10v37	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	39

Nombre del clon	CDR1	SEQ ID NO	CDR2	SEQ ID NO	CDR3	SEQ ID NO	VHH SEQ ID NO
hzB10v38	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	40
hzB10v39	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	41
hzB10v40	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	42
hzB10v40,52	GLTFSSYNMG	3	LSGVSSSTSTY	102	RRLLSTYWSHRSWDF	103	101
hzB10v41	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	43
hzB10v42	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	44
hzB10v43	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	45
hzB10v44	GLTFSSYNMG	3	LSGSSSTSTY	48	RRLLSTYWSDRSWDF	51	46
hzB10con	GLTFSSYNMG	3	XSGSSSTSTY	58	RRXLSTYWSDRSWDF	63	47
hzB10con-1	GLTFSSYNMG	3	X ₁ SGX ₂ SSTSTY	104	RRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF	109	119

Tabla 2B: CDRs de consenso VHH según la definición indicada

Región	Definición	Fragmento de secuencia	SEQ ID NO
CDR1	AbM	GLTFSSYNMG	3
	Chothia	GLTFSSY---	54
	Kabat	-----SYNMG	55
	Contacto	----SSYNMG	56
	IMGT	-LTFSSYN--	57
CDR2	AbM	---XSGSSSTSTY-----	58
	Chothia	-----GSSSTS-----	59
	Kabat	--- X ₁ SGSSSTSTYYAX ₂ X ₃ VKG	60
	Contacto	FVX ₁ X ₂ SGSSSTSTY-----	61
	IMGT	----SGSSSTST-----	62
CDR2 (con-1)	AbM	---X ₁ SGX ₂ SSTSTY-----	104
	Chothia	-----GXSSTS-----	105
	Kabat	---	106

Región	Definición	Fragmento de secuencia	SEQ ID NO
		X ₁ SGX ₂ SSTSTYYAX ₃ X ₄ VKG	
	Contacto	FVX ₁ X ₂ SGX ₃ SSTSTY-----	107
	IMGT	----SGXSSTST-----	108
CDR3	AbM	--RRXLSTYWSDRSWDF	63
	Chothia	--RRXLSTYWSDRSWDF	64
	Kabat	--RRXLSTYWSDRSWDF	65
	Contacto	AARRXLSTYWSDRSWD-	66
	IMGT	AARRXLSTYWSDRSWDF	67
CDR3 (con-1)	AbM	--RRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF	109
	Chothia	--RRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF	109
	Kabat	--RRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF	109
	Contacto	AARRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWD-	110
	IMGT	AARRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF	111

Tabla 2C: CDR de hzB10v37 a hzB10v44 de acuerdo con la definición indicada

Región	Definición	Fragmento de secuencia	SEQ ID NO
CDR1	AbM	GLTFSSYNMG	3
	Chothia	GLTFSSY---	54
	Kabat	-----SYNMG	55
	Contacto	----SSYNMG	56
	IMGT	-LTFSSYN--	57
CDR2	AbM	---LSGSSSTSTY-----	48
	Chothia	-----GSSSTS-----	59
	Kabat	--- LSGSSSTSTYYAESVKG	68
	Contacto	FVGLSGSSSTSTY-----	69
	IMGT	----SGSSSTST-----	70
CDR3	AbM	--RRLSTYWSDRSWDF	51
	Chothia	--RRLSTYWSDRSWDF	71

Región	Definición	Fragmento de secuencia	SEQ ID NO
	Kabat	--RRLLSTYWSDRSWDF	72
	Contacto	AARRLLSTYWSDRSWD-	73
	IMGT	AARRLLSTYWSDRSWDF	74

Tabla 2D: CDR1 y CDR3 de consenso de variantes de hzB10v40

Región	Definición	Fragmento de secuencia	SEQ ID NO
CDR1	AbM	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ YX ₆ X ₇ X ₈	114
	Chothia	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ Y	115
CDR3	AbM, Chothia, Kabat	RRX ₁ X ₂ SX ₃ YWSX ₄ RSWDX ₅	116
	Contacto	X ₁ ARRX ₂ X ₃ SX ₄ YWSX ₅ RSWD	118
	IMGT	X ₁ ARRX ₂ X ₃ SX ₄ YWSX ₅ RSWDX ₆	117

[00141] En diversas modalidades, los polipéptidos de unión a IgE en la presente comprenden al menos un dominio VHH que se une a IgE y comprende la secuencia CDR1 de SEQ ID NO: 3; una secuencia de CDR2 que se selecciona de las SEQ ID NO: 4, 48-50 y 102; y una secuencia de CDR3 que se selecciona de las SEQ ID NO: 5, 51-53 y 103. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, bajo cualquier sistema de CDR (*por ejemplo*, AbM, Chothia, Kabat, Contact, IMGT, *etc.*), de cualquiera de los VHH enumerados en la Tabla 2A anterior. Aunque las secuencias de CDR de cada VHH bajo cada definición de CDR no se proporcionan en el Listado de Secuencias, se pueden identificar mediante métodos conocidos en la técnica, *por ejemplo*, utilizando el servidor AbYsis (www.abysis.org/abysis/). Además, las secuencias de CDR de un dominio VHH dado bajo una definición de Chothia, Kabat, Contact o IMGT se pueden identificar alineando las secuencias de aminoácidos de VHH con una secuencia de referencia (*por ejemplo*, hzB10v37 a hzB10v44) y aislando las regiones correspondientes a las CDR de la secuencia de referencia bajo la misma definición de CDR. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 48 y 51. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 102 y

103. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 5. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 48 y 5. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 49 y 5. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 50 y 5. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 51. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 52. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4 y 53. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 48 y 52. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 48 y 53. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 49 y 51. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 49 y 52. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 49 y 53. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 50 y 51. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 50 y 52. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 50 y 53. En diversas modalidades, el dominio VHH está humanizado.

[00142] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de CDR2 XSGSSSTSTY, en donde X es leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o metionina (M) (SEQ ID NO: 58). En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de CDR3 RRXLSTYWSDRSWDF, en donde X es leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o metionina (M) (SEQ ID NO: 63). En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 58 y 63.

[00143] En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de CDR2 X₁SGX₂SSTSTY, en donde: X₁ es leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o metionina (M); y X₂ es serina (S) o valina (V) (SEQ ID NO: 104). En algunas modalidades, el dominio VHH comprende la secuencia de CDR3 RRX₁LSTYWSX₂RSWDF, en donde: X₁ es leucina (L), isoleucina (I), valina

(V) o metionina (M); y X₂ es aspartato (D) o histidina (H) (SEQ ID NO: 109). En algunas modalidades, el dominio VHH comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 104 y 109.

[00144] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende de una a tres CDR de un dominio VHH que se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 6-47, 101 y 119. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende de dos a tres CDR de un dominio VHH que se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 6-47, 101 y 119. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende tres CDR de un dominio VHH que se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 6-47, 101 y 119. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de CDR1 que se selecciona de las SEQ ID NO: 3 y 54-57; una secuencia de CDR2 que se selecciona de las SEQ ID NO: 4, 48-50, 58-62, 68-70 y 102; y una secuencia de CDR3 que se selecciona de las SEQ ID NO: 5, 51-53, 63-67, 71-74 y 103. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de contacto. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00145] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende secuencias de CDR1 y CDR3 de un dominio VHH que se selecciona de las SEQ ID NO: 2, 6-47, 101 y 119. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de CDR1 que se selecciona de las SEQ ID NO: 3 y 54-57; y una secuencia de CDR3 que se selecciona de las SEQ ID NO: 5, 51-53, 63-67, 71-74 y 103. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Kabat. En algunos aspectos, las CDR son CDR de Chothia. En algunos aspectos, las CDR son CDR de AbM. En algunos aspectos, las CDR son CDR de contacto. En algunos aspectos, las CDR son CDR de IMGT.

[00146] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende (a) una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de GX₁X₂X₃X₄X₅YX₆X₇X₈, en donde X₁ es L, I o V; X₂ es T, V, N, K o I; X₃ es F, Y, P o G; X₄ es S, K, A, D o R; X₅ es S, E, Q, T, R, A o P; X₆ es N, T, S o R; X₇ es M, V, I, L, S, T o F; y X₈ es G, S o A (SEQ ID NO: 114); o GX₁X₂X₃X₄X₅Y, en donde X₁ es L, I o V; X₂ es T, V, N, K o I; X₃ es F, Y, P o G; X₄ es S, K, A, D o R; y X₅ es S, E, Q, T, R, A o P (SEQ ID NO: 115), y (b) una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 116, 117 o 118. En algunas

modalidades, la CDR1 y CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos de 114 y 116; 114 y 117; 114 y 118; 115 y 116; 115 y 117; o 115 y 118, respectivamente. Algunos de los pares CDR1 y CDR3 se identifican bajo diferentes definiciones de CDR. No obstante, dichas coincidencias se seleccionan para cubrir todas las posiciones invariantes en las tres CDR, de acuerdo con los resultados del mapeo de parátomos descritos en el Ejemplo 11 a continuación.

[00147] En algunas modalidades, un dominio VHH o un polipéptido de unión a IgE proporcionado en la presente comprende CDR que tienen al menos aproximadamente 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % de identidad con una CDR1, CDR2 o CDR3 de las SEQ ID NO: 3, 4, 5, 48-74 o 102-111. En algunas modalidades, la CDR1 se selecciona de las SEQ ID NO: 3 y 54-57 con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, la CDR2 se selecciona de las SEQ ID NO: 4, 48-50, 58-62, 68-70, 102 y 104-108 con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos. En algunas modalidades, la CDR3 se selecciona de las SEQ ID NO: 5, 51-53, 63-67, 71-74, 103 y 109-111 con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos. En algunos aspectos, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservadoras. En algunas modalidades, los polipéptidos de unión a IgE descritos en este párrafo se denominan en la presente “variantes”. En algunas modalidades, dichas variantes se derivan de una secuencia proporcionada en la presente, por ejemplo, mediante maduración de afinidad, mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis aleatoria o cualquier otro método conocido en la técnica o descrito en la presente. En algunas modalidades, dichas variantes no se derivan de una secuencia proporcionada en la presente y pueden, por ejemplo, aislarse de novo de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para obtener polipéptidos de unión a IgE.

[00148] En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción comprende un parátomo que comprende el aminoácido 26 y/o 32 de la SEQ ID NO: 42, es decir, los aminoácidos 1 y/o 7 (G y/o Y, respectivamente) de la secuencia de CDR1 de hzB10v40 bajo la definición de AbM. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende un parátomo que comprende los aminoácidos 26 y 32 de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción comprende un parátomo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de los aminoácidos 26, 27, 32, 99, 100, 105, 106 y 110 de la SEQ ID NO: 42, es decir, los aminoácidos 1, 2 y 7 (G, L e Y, respectivamente) de la secuencia de CDR1, y los aminoácidos

1, 2, 7, 8 y 12 (R, R, Y, W y S, respectivamente) de la secuencia de CDR3, cada uno bajo la definición de AbM. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende un parátipo que comprende los aminoácidos 26, 27, 32, 99, 100, 105, 106 y 110 de la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción comprende un parátipo que

5 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de los aminoácidos 26, 27, 29, 32, 35, 52, 97, 98, 99, 100, 103, 105, 106, 107, 110, 111 y 112 de la SEQ ID NO: 42, *es decir*, los aminoácidos 1, 2, 4, 7 y 10 (G, L, F, Y y G, respectivamente) de la secuencia de CDR1 y el aminoácido 3 (G) de la secuencia de CDR2 de hzB10v40 bajo la definición de AbM, y los aminoácidos 1, 2, 3, 4, 7, 9, 10, 11, 14, 15 y 16 (A, A, R, R, S, Y, W, S, S, W y D,

10 respectivamente) de hzB10v40 bajo la definición de contacto. En algunas modalidades, el dominio VHH comprende un parátipo que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 de los aminoácidos 26, 27, 29, 32, 35, 52, 97, 98, 99, 100, 103, 105, 106, 107, 110, 111 y 112 de la SEQ ID NO: 42. Las posiciones de aminoácidos en este párrafo se refieren a las posiciones en las secuencias respectivas por mero recuento, que no es necesariamente

15 idéntico a las posiciones bajo el sistema de numeración de Kabat o Chothia. En algunas modalidades, el dominio VHH que tiene el parátipo especificado comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 42.

[00149] En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende un glutamato

20 (E), aspartato (D), lisina (K) o arginina (R) en la posición 11 de acuerdo con la numeración de Kabat. En determinadas modalidades, el dominio VHH puede comprender una modificación en Leu 11 dentro del marco 1. Por ejemplo, el dominio VHH puede comprender Leu11Glu (L11E), Leu11Asp (L11D), Leu11Arg (L11R) o Leu11Lys (L11K), en donde la numeración es de acuerdo con la numeración de Kabat. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE

25 comprende una leucina (L) en la posición 108 y/o, un glutamato (E), arginina (R) o aspartato (D) en la posición 112 de acuerdo con la numeración de Kabat. En determinadas modalidades, el dominio VHH puede comprender una modificación de uno o más de Gln 108 y Lys 112 dentro del marco 4. Por ejemplo, el dominio VHH puede comprender Gln108Leu (Q108L), Lys112Glu (K112E), Lys112Arg (K112R) o Lys112Asp (K112D), en donde la numeración es de acuerdo

30 con la numeración de Kabat. Se entenderá que las posiciones de Kabat 11, 108 y 112 corresponden a los residuos 11, 119 y 123, respectivamente, de la SEQ ID NO:2. En algunas

modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una extensión C-terminal de uno o más residuos de glicina. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una modificación en Leu 11 y una modificación en Lys 112. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una modificación en Leu 11, una modificación en Gln 108 y una modificación en Lys 112. En algunas de estas modalidades, el dominio VHH comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2 y 6-46. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NO: 2 y 6-46. En algunas modalidades, el dominio VHH que se une a IgE comprende la secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 119. En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE comprende una secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 47.

[00150] En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción compite con ligelizumab por la unión a IgE. En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción compite con 8D6 (UB-221) por la unión a IgE.

[00151] En algunas modalidades, un dominio VHH de la presente descripción no compite con omalizumab por la unión a IgE. En algunas modalidades, el dominio VHH se une a un epítipo de IgE diferente al de omalizumab. Se entiende que XmAb7195, un anticuerpo tradicional que se une a IgE e incluye una región Fc con mutaciones PROPIAS, causa trombocitopenia cuando se administra en dosis altas, potencialmente debido a la unión a un antígeno desconocido en las plaquetas. Sin desear limitarse a la teoría, se contempla que el dominio VHH de la presente descripción, al unirse a un epítipo diferente, es poco probable que cause el mismo efecto adverso, ya sea solo o fusionado a un dominio Fc (*por ejemplo*, un dominio Fc con mutaciones PROPIAS).

[00152] En diversas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende uno, dos, tres o cuatro dominios VHH que se unen a IgE.

[00153] En algunas modalidades, un dominio VHH que se une a IgE se humaniza. Los

anticuerpos humanizados (tales como sdAb o polipéptidos que contienen VHH) son útiles como moléculas terapéuticas porque los anticuerpos humanizados reducen o eliminan la respuesta inmunitaria humana a los anticuerpos no humanos, lo que puede dar como resultado una respuesta inmunitaria a un agente terapéutico de anticuerpos y una disminución de la eficacia del agente terapéutico. En general, un anticuerpo humanizado comprende uno o más dominios variables en los que las CDR (o partes de estas) se derivan de un anticuerpo no humano, y las FR (o partes de estas) se derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante humana. En algunas modalidades, algunos residuos de FR en un anticuerpo humanizado se sustituyen con residuos correspondientes de un anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo del que se derivan los residuos de CDR), por ejemplo, para restaurar o mejorar la especificidad o afinidad del anticuerpo.

[00154] Los anticuerpos humanizados y los métodos para producirlos se revisan, por ejemplo, en Almagro y Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633, y se describen adicionalmente, por ejemplo, en Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332:323-329; Queen *et al.*, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. EE. UU.* 86: 10029-10033; Patentes estadounidenses n.º 5.821.337, 7.527.791, 6.982.321 y 7.087.409; Kashmiri *et al.*, (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (que describe el "rejuvenecimiento"); Dall'Acqua *et al.*, (2005) *Methods* 36:43-60 (que describe "barajado de FR"); y Osbourn *et al.*, (2005) *Methods* 36:61-68 y Klimka *et al.*, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (que describe el enfoque de "selección guiada" para el barajado de FR).

[00155] Las regiones marco humanas que se pueden usar para la humanización incluyen, de modo no taxativo: regiones marco seleccionadas usando el método de "mejor ajuste" (ver, por ejemplo, Sims *et al.* (1993) *J. Immunol.* 151 :2296); regiones marco derivadas de la secuencia consenso de anticuerpos humanos de un subgrupo particular de regiones variables de cadena pesada (ver, por ejemplo, Carter *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 89:4285; y Presta *et al.* (1993) *J. Immunol.*, 151:2623); regiones marco maduras humanas (mutadas somáticamente) o regiones marco de la línea germinal humana (ver, por ejemplo, Almagro y Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); y regiones marco derivadas del cribado de bibliotecas de FR (ver, por ejemplo, Baca *et al.*, (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 y Rosok *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 271 :22611-22618). Típicamente, las regiones FR de un VHH se

reemplazan con regiones FR humanas para producir un VHH humanizado. En algunas modalidades, se reemplazan determinados residuos de FR de la FR humana para mejorar una o más propiedades del VHH humanizado. Los dominios VHH con dichos residuos reemplazados aún se denominan en la presente “humanizados”.

5 **[00156]** En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH descrito en la presente fusionado con una región Fc. En diversas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana, o se deriva de una región Fc humana. En algunas modalidades, una región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE es una región Fc humana y comprende una o más de las mutaciones, G236D, S267E y L328F. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE incluye una región Fc humana y comprende las mutaciones “SELF” S267E y L328F. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE incluye una región Fc humana y comprende las mutaciones “DSELF” G236D, S267E y L328F. En algunas de dichas modalidades, la región Fc puede ser un isotipo de IgG humana, tal como una IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE se deriva de una región Fc humana y comprende mutaciones diseñadas para la heterodimerización. Las regiones Fc que se pueden utilizar en un polipéptido de unión a IgE incluyen regiones Fc que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 75-83.

20 **[00157]** En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH descrito en la presente fusionado a una región Fc que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 79 u 80. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH descrito en la presente fusionado a una región Fc que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 81 o 82. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende al menos un dominio VHH descrito en la presente fusionado con una región Fc a través de un enlazador. En algunas modalidades, el enlazador comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 91.

25 **[00158]** En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 85 o 92. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 85 o 92. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 o 93. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE consta de la secuencia de aminoácidos de

la SEQ ID NO: 86 o 93. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 o 113. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE consta de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112 o 113.

[00159] En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE comprende medios para unirse a IgE humana, opcionalmente unirse a IgE humana en la región o regiones de IgE humana unidas por hzB10v40-IgG1 (por ejemplo, como se describe en los Ejemplos a continuación). En algunas modalidades, el medio se une a la región Fc de IgE humana. En algunas modalidades, el medio es un medio de dominio único (*por ejemplo*, VHH) para unirse a IgE humana. En algunas modalidades, el polipéptido de unión a IgE comprende además una región Fc, tal como una región Fc humana o una derivada de una región Fc humana. En algunas modalidades, el polipéptido de unión a IgE comprende una región Fc humana y comprende una o más de las mutaciones, G236D, S267E y L328F. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE incluye una región Fc humana y comprende las mutaciones “SELF” S267E y L328F. En algunas modalidades, un polipéptido de unión a IgE incluye una región Fc humana y comprende las mutaciones “DSELF” G236D, S267E y L328F. En algunas de dichas modalidades, la región Fc puede ser un isotipo de IgG humana, tal como una IgG1 humana. En algunas modalidades, la región Fc incluida en un polipéptido de unión a IgE se deriva de una región Fc humana y comprende mutaciones diseñadas para la heterodimerización. Las regiones Fc que se pueden utilizar en un polipéptido de unión a IgE incluyen regiones Fc que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 75-83. En algunas modalidades, el medio para unirse a IgE incluye los anticuerpos anti-IgE y fragmentos de unión a antígeno de estos descritos en la presente, opcionalmente excluyendo cx-Oma. En algunas modalidades, el polipéptido de unión a IgE que comprende medios para unirse a IgE humana es multivalente.

Expresión y producción de polipéptidos y proteínas

[00160] Se proporcionan moléculas de ácido nucleico que comprenden polinucleótidos que codifican un polipéptido o proteína de unión a IgE. En algunas modalidades, la molécula de ácido nucleico también puede codificar una secuencia líder que dirige la secreción del polipéptido o proteína de unión a IgE, cuya secuencia líder se escinde típicamente de modo que no esté presente en el polipéptido o proteína secretado. La secuencia líder puede ser una secuencia líder de cadena pesada (o VHH) nativa, o puede ser otra secuencia líder heteróloga.

[00161] Las moléculas de ácido nucleico se pueden construir utilizando técnicas de ADN

recombinante convencionales en la técnica. En algunas modalidades, una molécula de ácido nucleico es un vector de expresión que es adecuado para la expresión en una célula hospedadora seleccionada.

[00162] Se proporcionan vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y proteínas de unión a IgE descritos en la presente. Dichos vectores incluyen, de modo no taxativo, vectores de ADN, vectores de fagos, vectores virales, vectores retrovirales, etc. En algunas modalidades, se selecciona un vector que está optimizado para la expresión de polipéptidos o proteínas en un tipo de célula deseado, tal como células CHO o derivadas de CHO, o en células NSO. Estos vectores ejemplares se describen, por ejemplo, en Running Deer *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 20:880-889 (2004).

[00163] En algunas modalidades, un polipéptido o proteína de unión a IgE se puede expresar en células procariotas, tales como células bacterianas; o en células eucariotas, tales como células fúngicas (tales como levadura), células vegetales, células de insecto y células de mamífero. Dicha expresión se puede llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células eucariotas que se pueden utilizar para expresar polipéptidos y proteínas incluyen, de modo no taxativo, células COS, que incluyen células COS 7; células 293, incluidas las células 293-6E; Células CHO, incluyendo CHO-S, DG44. Células CHO Lec13 y células CHO FUT8; Células PER.C6® (Crucell); y células NSO. En algunas modalidades, los polipéptidos o proteínas de unión a IgE se pueden expresar en levadura. Ver, e.g., Publicación de Estados Unidos n.º US 2006/0270045 A1. En algunas modalidades, una célula hospedadora eucariota particular se selecciona en función de su capacidad para realizar las modificaciones postraduccionales deseadas en el polipéptido o proteína. Por ejemplo, en algunas modalidades, las células CHO producen polipéptidos o proteínas que tienen un mayor nivel de sialilación que el mismo polipéptido o proteína producido en células HEK 293.

[00164] La introducción de uno o más ácidos nucleicos (tales como vectores) en una célula hospedadora deseada se puede lograr mediante cualquier método, que incluye, de modo no taxativo, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, etc. Los métodos ilustrativos no taxativos se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3º ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Los ácidos

nucleicos se pueden transfectar de forma transitoria o estable en las células hospedadoras deseadas, de acuerdo con cualquier método adecuado.

[00165] También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente. En algunas modalidades, se proporciona una célula hospedadora que expresa un polipéptido o proteína de unión a IgE descrito en la presente. Los polipéptidos o proteínas de unión a IgE expresados en células hospedadoras se pueden purificar mediante cualquier método adecuado. Tales métodos incluyen, de modo no taxativo, el uso de matrices de afinidad o cromatografía de interacción hidrófoba. Los ligandos de afinidad adecuados incluyen el ECD de ROR1 y agentes que se unen a regiones Fc. Por ejemplo, se puede usar una proteína A, proteína G, proteína A/G o una columna de afinidad de anticuerpos para unirse a la región Fc y purificar un polipéptido o proteína de unión a IgE que comprende una región Fc. La cromatografía interactiva hidrófoba, por ejemplo, una columna de butilo o fenilo, también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos o proteínas tales como anticuerpos. La cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o cromatografía de intercambio catiónico) también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos o proteínas tales como anticuerpos. La cromatografía de modo mixto (por ejemplo, intercambio de fase inversa/aniónico, intercambio de fase inversa/catiónico, interacción hidrófila/intercambio aniónico, interacción hidrófila/intercambio catiónico, etc.) también puede ser adecuada para purificar algunos polipéptidos o proteínas tales como anticuerpos. Muchos métodos para purificar polipéptidos o proteínas son conocidos en la técnica.

[00166] En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE se produce en un sistema libre de células. Los sistemas sin células ejemplares no taxativos se describen, por ejemplo, en Sitaraman *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo *et al.*, *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

[00167] En algunas modalidades, se proporcionan polipéptidos o proteínas de unión a IgE preparados mediante los métodos descritos anteriormente. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE se prepara en una célula hospedadora. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE se prepara en un sistema libre de células. En algunas modalidades, el polipéptido de unión a IgE se purifica. En algunas modalidades, se proporciona un medio de cultivo celular que comprende un polipéptido o proteína de unión a

IgE.

[00168] En algunas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden anticuerpos preparados por los métodos descritos anteriormente. En algunas modalidades, la composición comprende un polipéptido o proteína de unión a IgE preparado en una célula hospedadora. En algunas modalidades, la composición comprende un polipéptido o proteína de unión a IgE preparado en un sistema libre de células. En algunas modalidades, la composición comprende un polipéptido o proteína de unión a IgE purificado.

Métodos de ejemplo para tratar enfermedades utilizando polipéptidos o proteínas de unión a IgE

[00169] En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar la enfermedad en un individuo que comprenden administrar un polipéptido o proteína de unión a IgE. En algunas modalidades, los métodos para tratar una enfermedad asociada con IgE. Dichas enfermedades incluyen alergias tales como alergias alimentarias (tales como, por ejemplo, alergia al maní, sésamo, leche, huevo, pescado o nueces de árbol), alergias ambientales (tales como, por ejemplo, alergia a los ácaros del polvo, polen, moho o látex), alergias a animales de compañía (tales como, por ejemplo, alergia a gatos, perros, cejillas, caballos o vacas) y alergias al veneno (tales como, por ejemplo, alergia a abejas, avispas o arañas). En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar trastornos alérgicos. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para reducir la IgE. El método comprende administrar al individuo una cantidad eficaz de un polipéptido o proteína de unión a IgE proporcionado en la presente. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE bloquea la unión de IgE a FCER1A. En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE inhibe la activación o desgranulación y, por lo tanto, la respuesta alérgica. En algunas de estas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE agota la IgE.

[00170] En algunas modalidades, el polipéptido o proteína de unión a IgE se une a un agente adicional, tal como un agente terapéutico adicional, para formar un inmunoconjugado.

[00171] En algunas modalidades, los métodos de tratamiento pueden ser en humanos o animales. En algunas modalidades, se proporcionan métodos para tratar seres humanos.

[00172] Los polipéptidos y proteínas de unión a IgE se pueden administrar según sea necesario a los sujetos. La determinación de la frecuencia de administración puede ser realizada por personas expertas en la técnica, tal como un médico tratante en función de

consideraciones de la afección que se está tratando, la edad del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección que se está tratando, el estado general de salud del sujeto que se está tratando y similares. En algunas modalidades, se administra una dosis eficaz de un polipéptido o proteína de unión a IgE a un sujeto una o más veces. En algunas modalidades, una dosis eficaz de un polipéptido o proteína de unión a IgE se administra al sujeto diariamente, semisemanalmente, semanalmente, cada dos semanas, una vez al mes, etc. Una dosis eficaz de un polipéptido o proteína de unión a IgE se administra al sujeto al menos una vez. En algunas modalidades, la dosis eficaz de un polipéptido o proteína de unión a IgE se puede administrar múltiples veces.

10 **[00173]** En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad asociada con IgE. La cantidad terapéuticamente eficaz depende típicamente del peso del sujeto que se está tratando, su condición física o de salud, la extensión de la afección a tratar o la edad del sujeto que se está tratando.

15 **[00174]** En algunas modalidades, los polipéptidos y proteínas de unión a IgE se pueden administrar *in vivo* por diversas vías, que incluyen, de modo no taxativo, intravenosa, intraarterial, parenteral, intraperitoneal o subcutánea. La formulación y la vía de administración adecuadas se pueden seleccionar de acuerdo con la aplicación prevista.

Composiciones farmacéuticas

20 **[00175]** En algunas modalidades, las composiciones que comprenden polipéptidos o proteínas de unión a IgE se proporcionan en formulaciones con una amplia variedad de portadores farmacéuticamente aceptables (ver, por ejemplo, Gennaro, Remington: La ciencia y la práctica de la farmacia con hechos y comparaciones: Drugfacts Plus, 20^o ed. (2003); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7^o ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3^o ed., Pharmaceutical Press (2000)). Están disponibles varios portadores farmacéuticamente aceptables, que incluyen vehículos, adyuvantes y diluyentes. Además, también están disponibles diversas sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste de pH y amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares.

30 Combiterapia

[00176] Los polipéptidos y proteínas de unión a IgE de la presente descripción se pueden

administrar solos o en combinación con otros modos de tratamiento, tales como un agente terapéutico adicional. El polipéptido o proteína de unión a IgE se puede proporcionar antes, sustancialmente contemporáneo con o después de uno o más modos de tratamiento (es decir, simultánea o secuencialmente).

5 Métodos de diagnóstico ejemplares no limitantes

[00177] En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente son útiles para evaluar un sujeto y/o una muestra de un sujeto. En algunas modalidades, la evaluación es uno o más de diagnóstico, pronóstico y/o respuesta al tratamiento.

10 **[00178]** En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden evaluar la presencia, ausencia o nivel de una proteína u otra molécula, por ejemplo, IgE, histamina, β -triptasa u otros mediadores alérgicos. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden evaluar una presencia, ausencia o nivel de expresión de un ácido nucleico. Las composiciones descritas en la presente se pueden utilizar para estas mediciones. Por ejemplo, en algunas modalidades, los métodos descritos en la presente comprenden poner
15 en contacto una muestra, suero o células de una muestra con un agente terapéutico como se describe en la presente.

Kits

[00179] También se proporcionan artículos de fabricación y kits que incluyen cualquiera de los polipéptidos o proteínas de unión a IgE como se describe en la presente, y un empaque
20 adecuado. En algunas modalidades, la invención incluye un kit con (i) un polipéptido de unión a IgE e (ii) instrucciones para usar el kit para administrar el polipéptido de unión a IgE a un individuo.

[00180] Los envases adecuados para composiciones, tales como composiciones farmacéuticas, que comprenden polipéptidos o proteínas descritos en la presente son conocidos
25 en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales (*por ejemplo*, viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (*por ejemplo*, Mylar sellado o bolsas de plástico) y similares. Estos artículos de fabricación pueden esterilizarse y/o sellarse adicionalmente. También se proporcionan formas de dosificación unitaria que comprenden las composiciones descritas en la presente. Estas formas de dosificación unitaria se pueden almacenar en un embalaje
30 adecuado en dosis unitarias únicas o múltiples y también se pueden esterilizar y sellar adicionalmente. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente

instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (*por ejemplo*, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles por máquina (*por ejemplo*, instrucciones transportadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico). Las instrucciones relacionadas con el uso de los anticuerpos generalmente incluyen información sobre la dosificación, el programa de dosificación y la vía de administración para el tratamiento o uso industrial previsto.

[00181] Los recipientes pueden ser dosis unitarias, paquetes a granel (*por ejemplo*, paquetes de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Por ejemplo, también se pueden proporcionar kits que contengan dosis suficientes de polipéptidos o proteínas descritos en la presente para proporcionar un tratamiento eficaz para un individuo durante un período prolongado. Los kits también pueden incluir múltiples dosis unitarias de polipéptidos o proteínas e instrucciones de uso y envasarse en cantidades suficientes para almacenamiento y uso en farmacias, por ejemplo, farmacias hospitalarias y farmacias de compuestos.

EJEMPLOS

[00182] Se pretende que los ejemplos discutidos a continuación sean puramente ilustrativos de la invención y no se debe considerar que limiten la invención de ninguna manera. Los ejemplos no pretenden representar que los experimentos a continuación son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números usados (*por ejemplo*, cantidades, temperatura, *etc.*) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmosférica.

Ejemplo 1: Desarrollo de polipéptidos de unión a IgE no activantes

[00183] Se generaron anticuerpos de dominio único (sdAb) dirigidos a IgE mediante inmunización de llamas y/o alpacas con IgE humana producida *in vitro* a partir de un hibridoma monoclonal y purificada por proteína L (Thermo Fisher Catalog # DIA HE1-01). Después del desarrollo de títulos de anticuerpos anti-IgE específicos, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de llama/alpaca de 500 ml de sangre del animal inmunizado y se aisló el ARNm total utilizando el kit Qiagen RNeasy Maxi y posteriormente se convirtió en ADNc de primera cadena utilizando Thermo Superscript IV Reverse Transcriptase y cebado con oligo-dT. Las secuencias de VHH se amplificaron específicamente mediante PCR utilizando el ADNc

como molde y se clonaron en un vector de presentación en superficie de levadura como proteínas de fusión VHH-Fc-AGA2.

[00184] Las bibliotecas de levaduras que muestran las proteínas de fusión VHH-Fc-AGA2 se enriquecieron en sdAb que se unen a IgE y bloquearon la unión de IgE a FCER1A utilizando formas recombinantes de IgE y FCER1A humanas mediante aislamiento de perlas magnéticas seguido de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). La levadura clasificada se colocó en placas y las colonias aisladas se recogieron en bloques de 96 pocillos y se llevó a cabo una inducción de la expresión en la superficie celular de levadura de la proteína de fusión VHH-Fc-AGA2. La IgE humana recombinante biotinilada o la proteína biotinilada irrelevante (IgE negativa) se aplicaron directamente a la levadura inducida, se lavaron, se trataron con estreptavidina marcada con fluoróforo y se analizaron mediante citometría de flujo de 96 pocillos.

[00185] Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican VHH que se unieron a IgE humana recombinante biotinilada y no a proteína biotinilada irrelevante se clonaron en marco con una región codificante de xELL de Fc humano en vectores de expresión de mamíferos y se expresaron mediante transfección transitoria en células HEK293 Freestyle (células 293) o células CHO usando polietilenimina. El sobrenadante se recogió después de 3-7 días, la proteína recombinante secretada se purificó mediante cromatografía de proteína A y la concentración se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm y el coeficiente de extinción.

[00186] El sdAb B10 anti-IgE se seleccionó para la humanización debido a su alta afinidad de unión a IgE soluble y al bloqueo eficaz de la unión de IgE a FCER1A, el receptor de IgE. Además, B10 exhibió baja unión a complejos IgE:FCER1A. Se generaron varias formas humanizadas de sdAb B10 basadas en los marcos de la cadena pesada humana VH3-23. Se realizaron varias rondas de humanización para reducir la inmunogenicidad potencial y optimizar la capacidad de fabricación. Se probaron ciertas mutaciones, por ejemplo, en CDR2 y CDR3, así como en cada una de las regiones marco. La unión de B10 original formateada como una proteína de fusión VHH hIgG1-Fc dimerica usando la xELL de Fc dimerizante y B10 original y variantes humanizadas y versiones humanizadas de estas formateadas como proteínas de fusión VHH-hIgG1-Fc monoméricas usando una región variante de Fc de IgG1 humana no dimerizante que carece de una bisagra y que comprende mutaciones en el dominio CH3 Fc NNT (SEQ ID NO: 83) se evaluó mediante citometría de flujo. Las células 293 se transfectaron

transitoriamente con un plásmido que codificaba los dominios constantes CH2-4 de IgE humana unidos a una proteína transmembrana para la expresión en la superficie celular con coexpresión de citrino en el mismo vector. Primero, se agregaron 25 µg de ADN al medio de suero reducido Opti-MEM (Gibco) mezclado con 75 µL de polietilenimina (PEI) de 40 kDa para una

5 concentración final de 1 µg de ADN y 2,5 µg de PEI por mL de volumen de cultivo. Se dejó que el ADN plasmídico se precomplejara con PEI durante 15 minutos antes de transferir la mezcla a 25 mL de 293 células en un matraz de agitación a una densidad de 2×10^6 células/mL. Los

10 matraces se incubaron a 37 °C con agitación, 250 rpm, con CO₂ al 8 % durante la noche para la validación de la expresión de IgE, así como para el análisis de la unión de la proteína de fusión VHH-hIgG1-Fc al día siguiente. Las células 293 transfectadas transitoriamente con los

plásmidos CH2-4-IgE de dominio constante se centrifugaron y se resuspendieron en amortiguador FACS hasta un recuento de 1×10^6 células/mL. A continuación, se transfirieron

15 50 µL de células a los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos de fondo redondo para un total de 50.000 células 293 por pocillo. En una placa de 96 pocillos separada, las proteínas de fusión VHH-hIgG1-Fc monoméricas se titularon 1:5 en una serie de dilución de 8 puntos a partir

de 1 µM en amortiguador FACS con el 8º punto que no contenía anticuerpo. Se agregaron 50 µL de cada dilución de anticuerpo a los pocillos que contenían 50 µL de amortiguador FACS

20 con células 293 transfectadas que produjeron una dilución de 2 veces de las concentraciones de anticuerpo de la serie de dilución, lo que resultó en una concentración inicial final de 500 nM de la titulación del artículo de prueba. Los artículos de prueba y las células 293 se incubaron

juntos a 4 °C durante 30 minutos. A continuación, las placas de 96 pocillos se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y se decantó el amortiguador FACS que contenía el anticuerpo no

unido. Las células se lavaron 1x con 150 µL de amortiguador FACS a 4 °C. Luego, se agregaron al sedimento celular 100 µL de fragmento Fcγ anti-IgG humana de burro específico de Alexa

25 Fluor® 647 AffiniPure diluido 1:10.000 en amortiguador FACS. Las células se incubaron con el anticuerpo de detección conjugado con fluoróforo a 4 °C durante 20 minutos. Luego, las células

293 se centrifugaron y se lavaron una vez como se describió anteriormente. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 30 µL de amortiguador FACS y se analizaron en un citómetro

de flujo iQue Screener Plus (Sartorius, IntelliCyt) con un tiempo de sorbo de 1 segundo y un

30 tiempo de vacío de 1 segundo. La intensidad fluorescente media se calculó utilizando el software de activación a bordo iQue en células GFP+ o citrino+.

[00187] Los datos se trazaron y analizaron usando el software de análisis GraphPad Prism. La afinidad aparente de la interacción de unión observada (K_d en nM) se determinó utilizando la fórmula de análisis total de un sitio $Y = B_{\text{máx}} * X / (K_d + X) + NS * X + \text{Fondo}$, donde $B_{\text{máx}}$ es la unión específica máxima en las mismas unidades que Y , K_d es la constante de disociación de equilibrio, en las mismas unidades que X (esta es la concentración necesaria para lograr una unión semimáxima en equilibrio) y NS es la pendiente de la unión no específica en unidades Y divididas por unidades X . El fondo fue la cantidad de señal no específica sin anticuerpo añadido. El porcentaje de fondo se calculó dividiendo el fondo dividido por $B_{\text{máx}}$ según lo calculado por el modelo de ajuste de curva y multiplicado por 100.

[00188] Las curvas de unión, los valores de $B_{\text{máx}}$ y K_d para las proteínas de fusión B10 VHH humanizadas se muestran en las Figuras 1A-1G. No se observó unión a células no transfectadas (datos no mostrados).

[00189] Las Figuras 2A-2B muestran un alineamiento del VHH de B10 parental con las formas humanizadas de B10 (hzB10v1-v18, v20-v34, v37-v44) y la secuencia aceptora de cadena pesada humana "VH3-23". Las secuencias también se proporcionan en la Tabla de Determinadas Secuencias. Se seleccionó la variante hzB10v14 parcialmente humanizada para los estudios iniciales. La variante hzB10v40 más optimizada y más humanizada se seleccionó para un análisis adicional, ya que fue el VHH más humano que retuvo una alta afinidad por IgE que se modificó con éxito para eliminar una cantidad de sitios potenciales de desaminación y oxidación que estaban presentes en la variante original y otras variantes humanizadas.

Ejemplo 2: Unión de polipéptidos a IgE y otros isotipos de inmunoglobulina

[00190] La unión de un polipéptido de unión a IgE bivalente que comprende el dominio VHH hzB10v14 descrito en el Ejemplo 1 a IgE humana y de mono cynomolgus se evaluó mediante ELISA. El polipéptido de unión a IgE comprendía el dominio VHH de hzB10v14, un enlazador compuesto por aminoácidos de glicina (SEQ ID NO: 91) y una variante de la región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones G236D, S267E y L328F (SEQ ID NO: 81, "DSELF"), la región Fc impulsará la formación de homodímeros. El polipéptido de dominio VHH hzB10v14 completo con región Fc de IgG1 DSELF se muestra en la SEQ ID NO: 84 ("cx12739"). Unión de un polipéptido de unión a IgE que comprende una versión humanizada del VHH de IgE026 descrito anteriormente (véase, por ejemplo, WO 2012/175740) fusionado a una variante de región Fc de IgG1 humana que comprende sustituciones S267E y L328F (SEQ ID NO: 89,

“SELF”) (“cx10759,” SEQ ID NO: 89) y un anticuerpo anti-IgE de longitud completa convencional, que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, e incluye la región Fc SELF de IgG1 (“cx10710”, SEQ ID NO: 87 y 88) también se ensayaron como aglutinantes de IgE comparativos. IgE humana comercial (AbCam, Cat. n.º Ab65866). En lugar de IgE de mono cynomolgus comercial, se generó una IgE de mono cynomolgus quimérica fusionando dominios constantes CH1-4 recombinantes de la IgE de Macaca fascicularis (número de acceso de GenBank EHH62331,1) y los dominios variables pesados y ligeros de una IgE de dinitrofenol anti-hapteno monoclonal de ratón.

[00191] La inmunoglobulina E de la especie indicada se inmovilizó en placas a 1 µg/mL en DPBS durante la noche a 4 °C. Las placas se lavaron para eliminar la IgE no unida. Todos los lavados se completaron utilizando un lavador de placas con DPBS que contenía Tween-20 suplementario al 0,05 % (“DPBST”) con tres lavados por ciclo de lavado. Después del lavado, los pocillos se bloquearon con 150 µL de DPBS que contenía albúmina de suero bovino al 3 % y se incubaron, agitando a 600 rpm (órbita de 1,5 mm) durante dos horas a temperatura ambiente y luego se lavaron.

[00192] Se realizó una titulación de 11 puntos de cada anticuerpo anti-IgE en DPBST, comenzando a partir de 250 nM, luego diluyendo 1:4 a través de la placa. El DPBST solo se usó como control negativo. 100 µL de los anticuerpos diluidos se aplicaron por duplicado en cada concentración y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, con agitación como se indicó anteriormente. Las placas se lavaron y los anticuerpos unidos se detectaron mediante la adición de 100 µL de anticuerpo policlonal específico de Fc gamma anti-humano de cabra conjugado con HRP a 100 ng/mL de DPBST a cada pocillo durante 30 minutos a temperatura ambiente, agitando como se indicó anteriormente. Las placas se lavaron y se desarrolló la señal de HRP agregando 100 µL de sustrato TMB a temperatura ambiente e incubando durante 5 minutos con agitación a 600 rpm. Luego se leyeron las densidades ópticas de la muestra a 650 nm en un lector de placas Molecular Devices Emax. Los datos se analizaron utilizando Prism 9 (GraphPad Software, LLC). La afinidad aparente de la interacción de unión observada (Kd en nM) se determinó utilizando One Site como se describió anteriormente. La señal de fondo (“2º”) debido a la unión del anticuerpo secundario y de detección se incluyó en los datos graficados como referencia.

[00193] Como se representa en las Figuras 3A-3B y la Tabla 3 a continuación, todos los

anticuerpos mostraron unión titulable a IgE humana, sin embargo, el anticuerpo de dominio único que comprende hzB10v14 (cx12739; SEQ ID NO. 84) no se unió a IgE de cynomolgus, lo que indica que se une a un epítipo único. Las constantes de afinidad de este estudio se representan en la Tabla 3.

5 **Tabla 3**

Anticuerpo	K _d aparente (nM); (Intervalo de confianza del 95 %)	B _{máx} (OD 650 nm)	SEQ ID NO(s)
IgE humana			
hzB10v14-DSELF (cx12739)	0,1971 (0,1664- 0,2334)	0,7418 (0,7129- 0,7707)	84
cx10759, que comprende Fc SELF de IgG1	0,1983 (0,7803- 0,8376)	0,8089 (0,7803- 0,8376)	89
cx10710, que comprende Fc SELF de IgG1	0,1024 (0,08933- 0,1174)	0,8142 (0,7893- 0,8391)	87, 88
IgE de mono cynomolgus			
hzB10v14-DSELF (cx12739)	sin vinculación	sin vinculación	84
cx10759, que comprende Fc SELF de IgG1	0,2546 (0,1641- 0,3962)	0,8861 (0,8079- 0,9648)	89
cx10710, que comprende Fc SELF de IgG1	0,2880 (0,2537- 0,3269)	0,8955 (0,8712- 0,9198)	87, 88

[00194] En un estudio adicional, la unión de un polipéptido de unión a IgE bivalente que comprende el dominio VHH hzB10v40 descrito en el Ejemplo 1 a humano (AbCam, Cat. n.º Ab65866), IgE de rata (LS Bio, Cat. n.º LS-G37860), IgE de ratón (Millipore, Cat. N.º D8406), IgA humana (Athensresearch, 16-16-090701), IgG2 humana (Athensresearch, 16-16-090707-

2) e IgM humana (Novus, NBP1-97056) se evaluó mediante ELISA esencialmente como se describió anteriormente. En un estudio adicional, la unión del anticuerpo anti-IgE designado cx13054 a IgE humana (AbCam, Cat. n.º Ab65866), IgE de cyno (generada internamente), IgE de rata (LS Bio, Cat. n.º LS-G37860), IgE de ratón (Millipore, Cat. n.º D8406), IgE de perro (Fortis Life Science, Cat. n.º P115), IgE de cerdo (Abbexa, Cat. N.º abx652112), IgA humana (Athensresearch, 16-16-090701), IgG2 humana (Athensresearch, 16-16-090707-2), IgM humana (Novus, NBP1-97056), IgD humana (AbCam, Cat. n.º Ab91022) se evaluó mediante ELISA esencialmente como se describió anteriormente. Un polipéptido de unión a IgE, designado "cx13032" (SEQ ID NO: 85), comprende el dominio VHH hzB10v40, un enlazador compuesto de aminoácidos de glicina (SEQ ID NO: 91) y la región Fc de DSELF de IgG1. Otro polipéptido de unión a IgE, designado "cx13054" (SEQ ID NO: 89), comprende el dominio VHH hzB10v40, un enlazador compuesto de aminoácidos de glicina (SEQ ID NO: 91) y la región Fc de SELF de IgG1. En este estudio también se examinó la unión de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 y cx10710. La señal de fondo debido a la unión del anticuerpo secundario y de detección se indica mediante la línea discontinua.

[00195] Como se representa en la Figura 3C y la Tabla 4, todos los anticuerpos anti-IgE basados en VHH de B10 mostraron unión titulable a IgE humana. Como se representa en las Figuras 3D y 3F-3H, el anticuerpo de un solo dominio que comprende el VHH hzB10v40 (cx13032) no mostró afinidad medible por la IgA o IgM humana, o la IgE de ratón o rata. Se observó una pequeña señal de unión para IgG2 humana en algunos estudios a altas concentraciones (ver Figura 3E). Se observaron resultados similares para cx13054 (SEQ ID NO: 86), que también comprende el VHH hzB10v40 (datos no mostrados). cx10710 tuvo una señal de unión pequeña, pero medible para IgA e IgM humanas, e IgE de ratón y rata. Como se representa en las Figuras 3I-3K, un anticuerpo de un solo dominio que comprende el VHH hzB10v40 (cx13054) no mostró afinidad medible por IgD humana e IgE de perro, con una señal de unión muy pequeña para IgE de cerdo a las concentraciones más altas. Por el contrario, cx10710 tuvo una señal de unión medible más grande para IgD humana, IgE de cerdo y perro. Las constantes de afinidad para la unión a IgE humana de este estudio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Anticuerpo	K _d aparente (nM);	B _{máx} (OD 650 nm)	SEQ ID NO(s)
------------	-------------------------------	------------------------------	--------------

	(Intervalo de confianza del 95 %)		
IgE humana			
hzB10v40-DSELF (cx13032)	0,2662 (0,2118- 0,3341)	0,8732 (0,8317- 0,9150)	85
cx10759, que comprende Fc SELF de IgG1	0,1760 (0,1196- 0,2576)	1,050 (0,9622-1,139)	89
cx10710, que comprende Fc SELF de IgG1	0,1270 (0,09197- 0,1749)	0,9458 (0,8823- 1,009)	87, 88

Ejemplo 3: Ensayos de unión a IgE por resonancia de plasmones superficiales y de bloqueo de FCER1A

[00196] La unión de un sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v14-IgG DSELF Fc (cx12739), a IgE humana directamente o a IgE precomplejada con FCER1A, y la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A se evaluó mediante resonancia de plasma superficial (SPR). También se examinó la capacidad de unión y bloqueo de una o ambas de las moléculas de comparador anti-IgE cx10759 y cx10710 en estos estudios. Todos los experimentos se realizaron utilizando un instrumento BIAcore T200 con un chip CM5 a 25 °C, la celda de flujo (FC) 1 se utilizó como referencia para FC2 y FC3 para FC4.

[00197] Para evaluar la unión a IgE inmovilizada, se usó IgE (Abcam ab65866) (solución madre de 3,2 µM) como ligando para capturar en el chip, se usaron cx10759 (solución madre de 10 µM) y cx12739 (solución madre de 10 µM) como analitos para fluir sobre las superficies inmovilizadas del ligando (a 25 °C). La proteína L (15 mg/mL) se diluyó (dilución 1:50, concentración diluida de 0,3 mg/mL) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM a pH 4,5 y se inmovilizó en las FC 1 y 2 a un nivel de ~13000 RU, usando la química de acoplamiento de aminas estándar. Se usó PBS-P (amortiguador fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) como amortiguador de corrida de inmovilización. La IgE se diluyó (dilución 1:250, concentración diluida de ~ 12,8 µg/mL) en PBS-P capturado en FC2 a un nivel de ~75 RU. Se usó PBS-P como el amortiguador de ejecución de captura. Se realizó la cinética durante la noche para todos los analitos en presencia de PBS-P. La velocidad de flujo

de todas las soluciones de analito se mantuvo a 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Los tiempos de contacto y disociación utilizados fueron de 120 segundos y 600 segundos, respectivamente. Se inyectó glicina pH 2,0 durante 20 segundos para la regeneración de la superficie. Esta condición de regeneración elimina todo el ligando capturado. Por lo tanto, se capturó una solución de ligando fresca al comienzo de cada ciclo de inyección. Las concentraciones de analito inyectado son de 50 nM a 0,098 nM (diluciones dobles). Todos los analitos se inyectaron por duplicado. Los sensorgramas de la cinética nocturna se evaluaron utilizando el ajuste del modelo de cinética 1:1. Las constantes de unión se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	χ^2	Valor U
hzB10v14-DSELF (cx12739)	$3,593 \times 10^5$	$2,88 \times 10^{-4}$	0,8	0,163	9
cx10759	$3,547 \times 10^6$	$4,15 \times 10^{-4}$	0,1	0,821	5

[00198] Como se muestra en la Tabla 5, el sdAb anti-IgE basado en B10 VHH hzB10v14-IgG DSELF Fc (cx12739) se une a IgE humana con afinidad subnanomolar. Aunque el VHH B10 mostró una afinidad de unión más baja (como se indica por el valor de K_D) en comparación con cx10759, tiene una velocidad de disociación más lenta (valor de k_d), lo que potencialmente da como resultado una mejor farmacocinética.

[00199] Para evaluar la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A, se utilizó FCER1A recombinante (ACRO FCA-H5228) (0,4 mg/ml de solución madre) como ligando para capturar en el chip CM5. Se utilizaron IgE (stock de 3,2 μM), cx10759 (stock de 10 μM), cx10710 (stock de 10 μM) y cx12739 (stock de 10 μM) como analitos para fluir sobre las superficies capturadas por el ligando. El anticuerpo anti-His (stock de 1 mg/ml) se diluyó (dilución 1:100, concentración diluida de 0,01 mg/ml) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM a pH 4,5 y se inmovilizó en FC 1 y 2 a un nivel de ~ 14000 RU, usando la química de acoplamiento de aminas estándar. Se usó PBS-P (amortiguador fosfato 20 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) como amortiguador de corrida de inmovilización. FCER1A (concentración stock de 0,4 mg/ml) se diluyó (dilución 1:250, concentración diluida de $\sim 0,004$ mg/ml) en PBS-P

capturado en FC2 a niveles de ~130 RU. Se usó PBS-P como el amortiguador de ejecución de captura. Se realizó la cinética durante la noche para todos los analitos en presencia de PBS-P. La velocidad de flujo de todas las soluciones de analito se mantuvo a 50 μ L/min. Los tiempos de contacto y disociación utilizados fueron de 120 segundos y 300 segundos, respectivamente.

5 Se inyectó glicina pH 1,5 durante 20 segundos para la regeneración de la superficie. Esta condición de regeneración elimina todo el FCER1A capturado. Por lo tanto, se capturó FCER1A fresco al comienzo de cada ciclo de inyección. Se inyectaron IgE 5 nM sola y 200 nM a 0,39 nM (diluciones dobles) de cx10759, cx10710 y cx12739 premezclados con IgE 5 nM. Todos los analitos se inyectaron por duplicado. Después de la inyección de todos los analitos, se recapturó
10 FCER1A fresco y se inyectaron manualmente 200 nM de cx10759, cx10710 y cx12739, lo que no dio como resultado ninguna unión significativa de todos los cx10759, cx10710 y cx12739 a FCER1A capturado. Los sensogramas de la cinética nocturna se trazaron para una evaluación adicional. Las curvas de inhibición se presentan en la Figura 4A-4C.

[00200] Como se representa en la Figura 4A el sdAb anti-IgE basado en VHH B10 (cx12739),
15 bloquea la unión de IgE soluble a FCER1A con una potencia similar a los dos anticuerpos comparadores cx10759 y cx10710, Figuras 4B y 4C, respectivamente.

[00201] Para evaluar la unión a IgE humana precomplejada con FCER1A, el anticuerpo anti-His (concentración de stock de 1 mg/ml) se diluyó (dilución 1:100, concentración diluida ~10 nM) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM a pH 4,5 y se inmovilizó en FC1 y FC2 usando
20 química de acoplamiento de amina estándar a un nivel de ~14000 RU. Se diluyó FCER1A (ACRO FCA-H5228) (dilución 1:175, concentración diluida ~100 nM) en HBS-P (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) y se capturó en FC2 a un nivel de ~420 RU. FCER1A se reticuló en el anticuerpo anti-his mediante una inyección de 20 segundos de NHS-EDC seguida de una inyección de 20 segundos de etanolamina. Se usó HBS-P como el
25 amortiguador de ejecución de captura.

[00202] Se diluyó FCER1A (dilución 1:175, concentración diluida ~100 nM) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM a pH 5,5 y se inmovilizó en FC4 a un nivel de ~385 RU. Se usó HBS-P como el amortiguador de ejecución de inmovilización. Se inyectaron 50 nM de IgE sobre las superficies inmovilizadas del ligando a una velocidad de flujo de 2 μ L/min en presencia de
30 HBS-P a un nivel de ~50 RU en FC2 y ~75 RU en FC4. Luego se inyectaron cx12739, cx10710 y cx10759 sobre la superficie capturada de IgE durante 1250 segundos, seguido de 600

segundos de disociación, en presencia de HBS-P, a una velocidad de flujo de 8 μ L/min. Finalmente se inyectaron dos pulsos de 15 segundos de glicina a pH 2,0 para la regeneración de la superficie. Esta condición de regeneración elimina la IgE capturada. Por lo tanto, se capturaron soluciones de IgE frescas al comienzo de cada ciclo de inyección. Las concentraciones de analito inyectado fueron 5000 nM, 1000 nM, 100 nM y 10 nM. Todos los analitos se inyectaron solo una vez. Los sensogramas representativos de las celdas de flujo acopladas a amina de inyecciones de analito de 1000 nM, 100 nM y 10 nM, con el blanco restado, se muestran en las Figuras 5A-5C, respectivamente.

[00203] Como se representa en las Figuras 5A-5C, el sdAb anti-IgE basado en VHH B10, hzB10v14-IgG DSELF Fc (cx12739) y el comparador de anticuerpos convencional, cx10710, demostraron poca o ninguna unión a complejos IgE:FCER1A a concentraciones inferiores a 1 μ M. Por el contrario, el comparador de sdAb anti-IgE basado en VHH 026 (cx10759) mostró una unión apreciable tan baja como 10 nM, lo que indica una afinidad mucho mayor por los complejos IgE:FCER1A. Dicha unión puede dar como resultado una activación directa independiente del antígeno.

Ejemplo 4: Ensayos ELISA de unión a IgE y de bloqueo de FCER1A

[00204] La unión de un sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032) a IgE humana y la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A se evaluó mediante ELISA. La capacidad de unión y bloqueo de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 y cx10710 también se examinaron en estos estudios.

[00205] Se recubrieron placas Medisorp con FCER1A-His humano recombinante (ACRO FCA-H5228) o IgE recombinante (Abcam ab65866) a 2 μ g/mL y se incubaron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las placas se bloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 30 min - 1 hora. Para la unión a IgE, se agregaron diluciones triples de once puntos replicadas en PBST de los anticuerpos a las placas recubiertas con IgE y bloqueadas con BSA y se dejaron agitar a 450 rpm a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, las placas se lavaron con PBST con el lavador de placas y se detectaron con anticuerpo de detección secundario específico de fragmento Fc γ anti-IgG humana de burro peroxidasa AffiniPure. Se agregó TMB a temperatura ambiente y se midió OD650 utilizando el lector de placas Emax. Para bloquear la unión de IgE a FCER1A de once puntos, se precomplejaron diluciones de cuatro veces de los anticuerpos con IgE diluida en PBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se

agregaron 100 uL de la mezcla de anticuerpo:IgE a placas recubiertas con FCER1A y bloqueadas con BSA. La concentración final de IgE fue de 5 nM y los artículos de prueba se titularon en 1:4 por duplicado con una concentración inicial de 500 nM. La concentración de IgE no cambió en la dilución. Después de 1 hora de incubación con agitación a temperatura ambiente, las placas se lavaron con PBST y se detectaron con anti IgE de conejo, anti-HRP de conejo. Se agregó TMB a temperatura ambiente y se midió OD650 utilizando el lector de placas Emax. Los datos se trazaron y analizaron usando el software de análisis GraphPad Prism. La afinidad aparente de la interacción de unión observada (K_d en nM) se determinó usando el Sitio Único como se describió anteriormente, y los IC_{50} s se determinaron mediante el ajuste de la curva predeterminada [Inhibidor] frente a la respuesta - Pendiente variable (cuatro parámetros) definida como $Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + (IC_{50}/X)^{\text{Pendiente de la Colina}})$.

[00206] Como se representa en la Figura 6A el sdAb anti-IgE basado en B10 VHH hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032) también se une a IgE humana con afinidad subnanomolar. Además, como se representa en la Figura 6B, el sdAb anti-IgE basado en VHH B10 bloquea la unión de IgE soluble a FCER1A con una potencia similar a los dos anticuerpos comparadores.

[00207] En otro estudio, la unión de otro sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v40-IgG SELF Fc (cx13054) a IgE humana y la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A o FCER2/CD23 (Acro CD3-H5249) se evaluó mediante ELISA esencialmente como se describió anteriormente, excepto que los anticuerpos se titularon a través de 1:3 por duplicado con una concentración inicial de 500 nM para los ensayos de inhibición, y una concentración inicial de 10 nM para el ensayo de unión de IgE. La capacidad de unión y bloqueo de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 y cx10710 también se examinaron en estos estudios.

[00208] El sdAb anti-IgE basado en B10 VHH zhB10v40-IgG SELF Fc (cx13054) también se une a IgE humana con afinidad subnanomolar (Figura 6C) y bloquea la unión de IgE soluble a FCER1A con una potencia similar a los dos anticuerpos comparadores (Figura 6D). Se observó que el sdAb anti-IgE basado en VHH de B10 bloqueaba la unión de IgE a FCER2 (CD23) en una relación 2:1 (anticuerpo:IgE), pero cuando VHH de B10 estaba a una concentración molar más baja que IgE, se observó un aumento en IgE unida a la superficie (Figura 6E). Sin limitarse a ningún mecanismo particular, esto puede deberse a que el anticuerpo basado en B10 forma complejos más grandes con IgE que pueden unirse a través de un sitio de unión a CD23 libre,

ya que no hay suficiente B10 para bloquear ambos lados del polipéptido de IgE. CD23 se une a ambos lados de una IgE, por lo que si B10 no se satura, los complejos B10:IgE pueden asociarse con CD23.

[00209] En otro estudio, se generó una variante de hzB10v40, llamada hzB10v40,52, con la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 101. Se esperaba que esta variante tuviera una menor probabilidad de inmunogenicidad que hzB10v40, de acuerdo con un algoritmo computacional. hzB10v40.52 se fusionó con un dominio Fc que contiene las mutaciones PROPIAS, formando un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 112 (hzB10v40,52-SELF). Esta construcción se comparó con hzB10v40-SELF en un ensayo ELISA de unión a IgE y un ensayo de bloqueo de FCER1A.

[00210] Para el ensayo ELISA de unión a IgE, los artículos de prueba se diluyeron en PBS-T y se titularon (once puntos) a través de la placa 1:3 por duplicado con una concentración inicial final de 100 nM. Para el ensayo ELISA de bloqueo de IgE, las diluciones del artículo de prueba se complejaron previamente con Abcam IgE diluido en PBS-T y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. 100 µL de esta mezcla de artículo de prueba: se agregó IgE a las placas Medisorp recubiertas con FCER1A y bloqueadas con BSA. La concentración final de IgE fue de 5 nM para todas las muestras y los artículos de prueba se titularon (once puntos) en 1:3 por duplicado con una concentración inicial final de 500 nM. La incubación, los lavados y la detección se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente en este Ejemplo 4. La afinidad aparente de la interacción de unión observada (K_d en nM) se determinó usando el Sitio Único como se describió anteriormente, y los valores de IC_{50} se determinaron mediante el ajuste de curva predeterminado como se describió anteriormente.

[00211] Como se representa en la Figura 6F, hzB10v40,52-SELF se unió a IgE con afinidad subnanomolar, a una afinidad similar a hzB10v40-SELF. Además, como se representa en la Figura 6G, hzB10v40,52-SELF bloqueó la unión de IgE soluble a FCER1A con un IC_{50} similar al hzB10v40-SELF.

Ejemplo 5: Inhibición de la unión de IgE a mastocitos y unión a IgE precomplejada con FCER1A en mastocitos

[00212] Siguiendo un protocolo de 10 semanas descrito por Madeleine Radinger et. al, *Current Protocols in Immunology* 2010, (91:7.38.1-7.38.9.), se descongelaron progenitores de células madre CD34+ de sangre periférica movilizada humana criopreservados de dos

donantes sanos normales (Stemexpress Cat# MLEG34005C) y se diferenciaron *in vitro* en mastocitos. En primer lugar, las células progenitoras se estimularon con interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6) y factor de células madre humanas recombinantes (rhSCF) durante una semana de cultivo en medio StemPro™-34 SFM (Gibco Cat#10639011). Después de este período de tiempo, las células se expandieron en volumen con medio de cultivo celular StemPro™-34 SFM que contenía solo IL-6 y rhSCF durante 8 semanas. En la semana 10 en la diferenciación completa, estas células expresaron una combinación de receptores de células de superficie que son distintos de los mastocitos humanos, incluido FCER1A. Los mastocitos derivados *in vitro* también son capaces de activarse y experimentar desgranulación tras la reticulación de FCER1A.

[00213] SdAb anti-IgE a base de VHH representativos de B10, Fc de DSELF de hzB10v40-IgG (cx13032) y una construcción relacionada de Fc SELF de hzB10v40-IgG que comprende el mismo VHH unido a una región de Fc SELF de IgG1 humana (cx13054, SEQ ID NO: 86), se analizaron para determinar la capacidad de bloquear la unión de IgE soluble a los mastocitos derivados *in vitro* descritos anteriormente. Los anticuerpos hzB10v40 se precomplejaron con IgE (5 nM final, Abcam ab65866) y se incubaron en amortiguador FACS a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregaron diluciones cuádruples de once puntos (comenzando a 500 nM, en amortiguador FACS) de los anticuerpos complejados a los mastocitos (25k células/pocillo) y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las células luego se lavaron y se tiñeron con anticuerpos de detección secundarios (IgE-APC y anti-FCER1A-FITC) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los mastocitos se lavaron dos veces y los anticuerpos unidos se detectaron mediante citometría de flujo (Novocyte). Los datos se trazaron usando el software de análisis GraphPad Prism. Los IC₅₀ se determinaron mediante el ajuste de curva predeterminado [Inhibidor] frente a la respuesta como se describió anteriormente. Los datos de un donante representativo se muestran en la Figura 7A.

[00214] Como se representa en la Figura 7A los sdAb anti-IgE basados en VHH B10, hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032) y hzB10v40-IgG SELF Fc (cx13054), bloquean la unión de IgE soluble a FCER1A con una potencia similar.

[00215] También se evaluó la unión de los sdAb anti-IgE basados en B10 VHH, cx13032 y cx13054, a IgE precomplejada con FCER1A en la superficie del mástil. En este estudio también

se examinó la unión de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 y cx10710. Los mastocitos (preparados como se describió anteriormente) se trataron previamente con IgE humana 10 nM (Abcam) en medio StemPro™-34 y se incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente, los mastocitos se lavaron y se colocaron en placas con 25k células/pocillo y se incubaron con anticuerpos anti-IgE titulados (once puntos, diluciones de cuatro veces a partir de 1000 nM en amortiguador FACS) durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavaron y luego se tiñeron con anticuerpos de detección secundarios (anti-hFc-488 y anti-cKit-APC) y se analizaron en el citómetro de flujo Novocyte 3000. Los datos se trazaron usando el software de análisis GraphPad Prism. Los datos de un donante representativo se presentan en la Figura 7B.

[00216] Como se representa en la Figura 7B los sdAb anti-IgE basados en VHH B10 (cx13032 y 13054), y el comparador de anticuerpos convencional, cx10710 no se unen a IgE unida a FCER1A en mastocitos. Por el contrario, el comparador de sdAb anti-IgE basado en VHH 026, cx10759, mostró una unión apreciable, dicha unión puede dar como resultado una activación directa independiente del antígeno.

Ejemplo 6: Evaluación de la activación de mastocitos

[00217] Los sdAb anti-IgE basados en VHH B10 representativos, hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032) y hzB10v40-IgG SELF Fc (cx13054) se probaron para determinar la capacidad de inhibir la activación de los mastocitos y estimular la activación directa independiente del antígeno de los mastocitos, utilizando la expresión de CD63 como marcador de la activación de los mastocitos. Como se señaló anteriormente, la unión a IgE complejada con FCER1A puede dar como resultado una activación directa indeseable. También se examinó la actividad de una o ambas de las moléculas de comparador anti-IgE cx10759 y cx10710 en estos estudios.

[00218] Se produjo una IgE (rhIgE) de dinitrofenol (DNP) antihapteno humano recombinante capaz de inducir la activación de mastocitos cuando se expuso a un conjugado de DNP-albúmina de suero humano ("DNP-HSA") polivalente utilizando la secuencia de dominio constante del número de acceso de GenBank AAB59424,1. Los mastocitos derivados in vitro, cultivados como se describió anteriormente, se colocaron en placas (30k células/pocillo) en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos. Todas las incubaciones en este ensayo se llevaron a cabo a 37 °C, 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada con camisa de agua. Para la evaluación de la inhibición de la activación de mastocitos, los anticuerpos anti-IgE (cx13032, cx13054 y cx10710) se titularon (diluciones de nueve puntos, cuatro veces) y se agregaron

volúmenes iguales de rhlgE 15 nM a los anticuerpos diluidos y los controles de amortiguador solo. Las mezclas de anticuerpo/IgE se incubaron durante 30-60 minutos a 37 °C, luego se agregaron 50 µL de la mezcla de IgE/anticuerpo o IgE 5 nM sola (como control positivo) a los mastocitos en 50 µL de amortiguador de Tyrode + BSA al 0,1 % y se incubaron durante 30-60 minutos. Los sobrenadantes se decantaron y las células se lavaron dos veces en 200 µL de amortiguador de Tyrode + BSA al 0,1 %, luego se agregaron 100 µL de DNP-HSA diluido a 50 ng/mL en amortiguador de Tyrode a 37°C a todas menos las células de control no estimuladas para estimular la activación durante 1 hora. El sobrenadante se retiró y los mastocitos se tiñeron para determinar la expresión de CD63 usando anti-CD63-FITC (Biolegend, Cat# 353006) y cKit-APC (Biolegend, Cat# 375204). La activación de los mastocitos se determinó evaluando la expresión de CD63 mediante citometría de flujo (novocito).

[00219] Para la evaluación de la activación directa (independiente del antígeno), los mastocitos se colocaron en placas como se describió anteriormente y se incubaron con rhlgE 5 nM durante la noche en medio StemPro™-34. Al día siguiente, los mastocitos se lavaron y se incubaron con diluciones de cuatro veces de nueve puntos de los anticuerpos anti-IgE (cx13032, cx13054, cx10759 y cx10710) en amortiguador de Tyrode de 100 µL o amortiguador solo (pocillos de control positivo) durante 1 hora. Los pocillos de control positivo se trataron con DNP-HSA. El sobrenadante se retiró y los mastocitos se tiñeron para la expresión de CD63 como se describió anteriormente. La activación de los mastocitos se determinó evaluando la expresión de CD63 mediante citometría de flujo (novocito). Los datos se trazaron y analizaron usando el software de análisis GraphPad Prism. Los IC₅₀ se determinaron mediante el ajuste de curva predeterminado [Inhibidor] frente a la respuesta como se describió anteriormente y se presentan en la Tabla 6. Los datos de un donante representativo se presentan en la Figura 8A-8B.

[00220] Como se representa en la Figura 8A y la Tabla 6, los sdAb anti-IgE basados en B10 VHH (cx13032 y cx13054), inhibieron la activación dependiente de antígeno de las células modificadas con una IC₅₀ similar a cx10710. Como se representa en la Figura 8B, los sdAb anti-IgE basados en B10 VHH (cx13032 y cx13054), no condujeron a la activación en ausencia de antígeno DNP-HSA, ni tampoco el comparador de anticuerpos convencional, cx10710. Por el contrario, el tratamiento con el comparador de sdAb anti-IgE basado en VHH 026, cx10759, condujo a la activación en ausencia de antígeno DNP-HSA.

Tabla 6: Activación después de la coincubación de IgE y anticuerpos

Anticuerpo	Activación IC ₅₀ (nM)	SEQ ID NO(s)
hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032)	3,086	85
hzB10v40-IgG SELF Fc (cx13054)	2,059	86
cx10710, que comprende Fc SELF de IgG1	1,929	87, 88

Ejemplo 7: Ensayos de unión a IgE por resonancia de plasmones superficiales y de bloqueo de FCER1A

[00221] La unión de sdAb anti-IgE basados en VHH B10 representativos adicionales, hzB10v40-IgG DSELF Fc (cx13032) y hzB10v40-IgG SELF Fc (cx13054), a IgE humana directamente o a IgE precomplejada con FCER1A, y la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A se evaluó mediante resonancia de plasma superficial (SPR). La capacidad de unión y bloqueo de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 o cx10710 también se examinaron en estos estudios. Todos los experimentos se realizaron utilizando un instrumento Biacore T200 con un chip CM5 a 37°C, excepto la inmovilización de la proteína L, que se realizó a 25°C.

[00222] Para evaluar la unión a IgE inmovilizada a tres densidades diferentes, se utilizó IgE (stock de 4,7 µM) y se utilizaron cx13032, cx13054 y cx10759 (cada uno a una concentración de stock de 10 µM) como analitos para fluir sobre las superficies inmovilizadas del ligando. Para este estudio, la celda de flujo (FC) 1 se usó como referencia para FC2, FC3 y FC4. La proteína L (concentración de stock de 15 mg/ml) se diluyó (dilución 1:50, concentración diluida de 0,3 mg/ml) en amortiguador de acetato de sodio 10 mM a pH 4,5 y se inmovilizó en todas las FC a un nivel de ~14000 RU, usando la química de acoplamiento de aminas estándar. Se usó HBS-P (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) como amortiguador de ejecución de inmovilización. La IgE se diluyó (dilución 1:3750, ~1,25 µg/ml de concentración diluida, baja densidad) en HBS-P capturado en FC2 a un nivel de ~14 RU (IgE-LD). La IgE se diluyó (dilución 1:375, concentración diluida de ~ 12,5 µg/ml, densidad media comparable a la utilizada en el Ejemplo 3) en HBS-P capturado en FC3 a un nivel de ~114 RU (IgE-MD). La IgE se diluyó (dilución 1:37,5, concentración diluida de ~125 µg/ml, alta densidad) en HBS-P capturado en FC4 a un nivel de ~1400 RU (IgE-HD). Se usó HBS-P como el amortiguador de ejecución de captura. Se realizó una cinética nocturna para todos los analitos en presencia de HBS-P. La velocidad de flujo de todas las soluciones de analito se mantuvo a 50 µL/min. Los tiempos de contacto y disociación utilizados fueron de 120 segundos y 600 segundos, respectivamente. Se inyectó glicina pH 1,5 durante 20 segundos para la regeneración de la

superficie. Esta condición de regeneración elimina todo el ligando capturado. Por lo tanto, se capturó una solución de ligando fresca al comienzo de cada ciclo de inyección. Las concentraciones de analito inyectado son de 80 nM a 0,01953 nM (diluciones de cuatro veces). Todos los analitos se inyectaron por duplicado. Los sensorgramas de la cinética nocturna se evaluaron utilizando el ajuste del modelo de cinética 1:1.

[00223] Las constantes de unión para todas las densidades de IgE se presentan en la Tabla 7 y demuestran que los sdAb anti-IgE basados en VHH B10 adicionales (cx13032 y cx13054) también se unen a IgE humana con afinidad subnanomolar excepto a la densidad de IgE más alta donde se observó una afinidad nanomolar muy baja.

10 **Tabla 7**

Anticuerpo	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (nM)	Chi ²	Valor U
IgE de baja Densidad					
hzB10v40-DSELF (cx13032)	$4,216 \times 10^5$	$4,495 \times 10^{-4}$	0,6	0,0199	5
hzB10v40-SELF (cx13054)	$5,344 \times 10^5$	$4,397 \times 10^{-4}$	0,8	0,0891	7
cx10759	$3,736 \times 10^6$	$3,842 \times 10^{-4}$	0,1	0,221	9
IgE de densidad media					
hzB10v40-DSELF (cx13032)	$3,726 \times 10^5$	$2,067 \times 10^{-4}$	0,6	0,368	5
hzB10v40-SELF (cx13054)	$4,150 \times 10^5$	$2,592 \times 10^{-4}$	0,6	0,598	5
cx10759	$7,969 \times 10^6$	$3,711 \times 10^{-4}$	0,05	1,20	5
IgE de alta densidad					
hzB10v40-DSELF (cx13032)	$2,424 \times 10^5$	$2,583 \times 10^{-4}$	1,1	13,5	2
hzB10v40-SELF (cx13054)	$2,531 \times 10^5$	$2,498 \times 10^{-4}$	1,0	18,6	3
cx10759	$1,067 \times 10^6$	$3,226 \times 10^{-4}$	0,3	63,7	3

[00224] Para evaluar la capacidad de bloquear la unión de IgE a FCER1A, se usó FCER1A

(solución madre etiquetada con His, 0,4 mg/ml) como ligando para capturar en el chip CM5. Se utilizaron IgE (solución madre 5,3 μ M), cx13054, cx13032 y cx10710 (cada uno a 10 μ M de solución madre) como analitos para fluir sobre las superficies capturadas de ligando esencialmente como se describe en el Ejemplo 3 anterior, excepto que se utilizó HBS-P (Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,05 % v/v) como amortiguador de ejecución de inmovilización y captura, y para todas las ejecuciones cinéticas durante la noche. Para estos estudios se inyectaron 5 nM de IgE sola y 50 nM a 0,39 nM (diluciones dobles) de cx13032, cx13054 y cx10710 premezclados con 5 nM de IgE. Los sensogramas de la cinética nocturna se trazaron para una evaluación adicional. Las curvas de inhibición se presentan en la Figura 9A-9C.

[00225] Como se representa en la Figura 9A-9B los sdAb anti-IgE basados en B10 VHH cx13032 (Figura 9A) y cx13054 (Figura 9B) bloquea la unión de IgE soluble a FCER1A con una potencia similar al anticuerpo comparador cx10710 (Figura 9C).

Ejemplo 8: Prueba de activación de basófilos (BAT)

[00226] Se probaron ciertos sdAb de unión a IgE para determinar la capacidad de activar basófilos en sangre completa en una prueba de activación de basófilos (BAT) para determinar si reticulan IgE y activan basófilos a través de FCER1A en ausencia de antígeno. La reticulación de IgE unida a FCER1A en basófilos conduce a la activación de basófilos y la liberación de mediadores de alergia. La capacidad de cx13032, cx13054 y las moléculas comparadoras cx10759 y cx10710 para inducir la señalización independiente de antígeno a través de IgE unida a FcER1A se determinó utilizando una prueba de activación de basófilos (BAT) (Flow Contract Site Laboratories, Bothell, WA). Un stock de trabajo 3X de los anticuerpos anti-IgE (0,75, 3 y 9 μ M) y dos controles positivos de mAb anti-FceR1 (30 mg/mL; clon AER-37 (CRA1), Thermo Fisher) y fMLP (90 nM; Sigma) en amortiguador de dilución (RPMI 1640 con IVIG (6 mg/ml final)). Se colocaron 50 μ L de cada artículo de prueba 3X o amortiguador de dilución solo en tubos duplicados y se agregaron 100 μ L de sangre completa (recolectada de donantes en tubos de recolección de sangre heparinizada de sodio) y las muestras se incubaron durante 30-35 minutos a 37 °C en un baño de agua. Luego se colocaron las muestras en hielo y se agregaron 5 μ L de EDTA 3 mM frío a cada tubo, seguido de 100 μ L de tinte Zombie Aqua Viability 1:500 (BioLegend) y 18,5 μ L de cóctel de anticuerpos (CCR3 (5E8-V421); HLADR (L243-PE); CD63 (H5C6-APCCy7); CD203c (NP4D6-PECy7); CD123 (6H6-FITC); y BV510-agua) y las muestras

se incubaron durante 30-35 minutos en hielo en la oscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron con 3 mL de amortiguador de lavado (amortiguador de tinción BSA (Becton Dickinson) con EDTA 3 mM (en amortiguador DPBS)), se retiró el sobrenadante y se agregaron 4 mL de 1X Pharm Lyse, los tubos se agitaron con vórtice y se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 10-12 minutos. Las muestras se lavaron nuevamente con 3 mL de amortiguador de lavado y se resuspendieron en 150 μ L de amortiguador de lavado y las poblaciones celulares se examinaron mediante citometría de flujo (FACSCanto™ o FACSCantoII™) y se analizaron con el software BDFACSDiva™, mediante la selección de basófilos CCR3⁺ CD123⁺ HLADR⁻ e informando intensidades medias de fluorescencia (MFI) tanto para CD63 como para CD203c, que son marcadores bien establecidos para la activación de basófilos. El % CD63⁺ se determinó usando controles no estimulados para establecer la puerta positiva y los datos para 12 donantes tratados con 250 nM, 1 μ M o 3 μ M de los anticuerpos anti-IgE se muestran en la Figura 10A-10C.

[00227] Como se representa en la Figura 10A-10C, no se observó una regulación positiva significativa de CD63 para los basófilos incubados con hzB10v40-IgG1 DSELF Fc (cx13032) o hzB10v40-IgG1 SELF Fc (cx13054) para ninguno de los donantes examinados, lo que indica que los anticuerpos derivados de B10 no indujeron la activación de basófilos independiente del antígeno en un amplio intervalo de concentraciones. Si bien no se observó una regulación positiva significativa para el comparador de anticuerpos convencional (cx10710), el sdAb basado en 026 (cx10759) exhibió una regulación positiva significativa de CD63 en un amplio rango de concentraciones y entre muchos donantes. El control positivo, anti-FCER1A, se graficó e indujo una regulación positiva significativa de los marcadores BAT.

[00228] Las muestras de sangre completa de los 12 donantes en el estudio anterior tienen varios niveles de sensibilidad, debido a la heterogenicidad en la población humana. cx13054 y cx10759 se compararon adicionalmente en el ensayo de prueba de activación de basófilos (BAT), utilizando muestras de sangre completa de cuatro donantes que se sabía que tenían una mayor sensibilidad. La regulación positiva de CD63 en las muestras tratadas con 250 nM, 1 μ M o 3 μ M de cx13054 y cx10759 se graficó en histogramas. Como se representa en las Figuras 10D-10G (una cifra por donante), cx10759 exhibió una regulación positiva significativa de CD63 en un amplio rango de concentraciones en los cuatro donantes. Esto se refleja no solo en la inducción de un nuevo pico en la compuerta P5, que generalmente corresponde a basófilos

completamente desgranulados, sino también en el ensanchamiento del pico principal que indica una desgranulación parcial en los basófilos.

Ejemplo 9: Interacción de FcεR1:IgE con hzB10v40-IgG1

[00229] La capacidad de un sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v40-IgG1 SELF Fc (cx13054) para interactuar con IgE humana que estaba precomplejada con FcεR1A se evaluó mediante resonancia de plasma superficial (SPR). En estos estudios también se examinó la capacidad de una molécula comparadora anti-IgE derivada de Omalizumab (“cx-Oma”) para interactuar con IgE.

[00230] Para evaluar la interacción con IgE en complejo con FcεR1A, el dominio extracelular de FcεR1A fusionado con una etiqueta His se conjugó con amina al chip C1. Para cada ejecución, se cargó IgE nueva en el chip conjugado con FcεR1A. Después de la formación del complejo FcεR1A:IgE, se inyectaron los analitos cx13054 y cx-Oma sobre las superficies inmovilizadas del ligando (a 37 °C) a concentraciones de 5000 nM (Figura 11A), 1000 nM (Figura 11B), 100 nM (Figura 11C) y 10 nM (Figura 11D). Las fases de asociación y disociación duraron 1250 segundos y 600 segundos, respectivamente. Se analizaron los sensogramas de para determinar el desplazamiento de IgE del complejo FcεR1:IgE.

[00231] Como se representa en las Figuras 11B-11D, las concentraciones de cx13054 o cx-Oma de hasta 1000 nM tuvieron una interacción mínima o nula con el complejo FcεR1:IgE. Como se representa en la Figura 11A, a 5000 nM cx13054 IgE mínimamente desplazada mientras que cx-Oma demostró una mayor capacidad relativa para desplazar IgE.

Ejemplo 10: Competencia de hzB10v40-IgG1 con anticuerpos IgE de referencia

[00232] Para mapear un sitio de unión putativo de sdAb anti-IgE basado en VHH B10, competencia del hzB10v14-IgG1-SELF (“739”; SEQ ID NO: 95) VHH, un análogo de hzB10v40, para la unión de IgE con anticuerpos IgE de referencia se evaluó mediante resonancia de plasma superficial (SPR). La capacidad de los anticuerpos de referencia anti-IgE 710 (un derivado de Omalizumab), Ligelizumab monocatenario (sc-Ligelizumab) que comprende la secuencia VH de la SEQ ID NO: 96 y la secuencia de VL de la SEQ ID NO: 97, y 8D6 de cadena simple (sc8D6) que comprende la secuencia de VH de la SEQ ID NO: 98 y la secuencia VL de la SEQ ID NO: 99 (también conocido como UB-221) para desplazar el VHH 739 de IgE se examinó en estos estudios.

[00233] Todos los experimentos se realizaron utilizando un instrumento Biacore T200 con un

chip CM5. En primer lugar, el 739 VHH (**Figuras 12A, 13A y 14A**), 710 (**Figuras 12B y 12C**), sc-Ligelizumab (scLig) (**Figura 13B**) o sc8D6 (**Figura 14B**) se conjugó con amina a un chip CM5. La superficie del chip se cargó luego con IgE y posteriormente se saturó con el mismo anticuerpo que se conjugó con el chip. Luego se inyectó la superficie con un pulso de analito de 739 VHH (**Figuras 12B, 12C, 13B y 14B**), 710 (**Figura 12A**), sc-Ligelizumab (**Figura 13A**), o sc8D6 (**Figura 14A**). Los analitos se procesaron con aproximadamente 300 s de asociación y aproximadamente 300 s de fases de disociación. Las concentraciones de los analitos variaron de 5000 nM a 1 nM. Todos los analitos se inyectaron por duplicado. Se evaluaron los sensogramas para determinar la unión conjunta a IgE o el desplazamiento del anticuerpo unido inicialmente a IgE.

[00234] Las Figuras 12A-12C muestran la unión conjunta de 739 VHH y 710 a IgE. Cuando la IgE se saturó primero con el VHH 739 y luego se pulsó sc-Ligelizumab sobre el chip, la Figura 13A muestra el desplazamiento del VHH 739 de IgE, lo que indica una unión superpuesta a IgE del VHH 739 y sc-Ligelizumab. Sin embargo, se observó unión conjunta en las condiciones inversas (Figura 13B). Se observó el desplazamiento del 739 VHH cuando la IgE se saturó primero con el 739 VHH y luego se pulsó sc8D6 sobre el chip (Fig 14A), lo que indica una unión superpuesta a IgE del 739 VHH y sc8D6. Sin embargo, se observó unión conjunta en las condiciones inversas (Figura 14B).

[00235] Las Figuras 15A-15D muestran las estructuras cristalinas de FceR1A (Figura 15A), 8D6 (Figura 15B), Ligelizumab (Figura 15C) y Omalizumab (Figura 15D) en complejo con el dominio IgE C ϵ indicado. Con base en los datos de competencia, el sitio de unión probable para el VHH 739, que se superpone con el de ligelizumab y 8D6 pero no Omalizumab, se indica mediante la flecha en la Figura 15B.

Ejemplo 11: Mapeo de mutagénesis parsimoniosa del parátipo B10 VHH

[00236] Para determinar los residuos de parátipo VHH B10 importantes para la unión a IgE, se mutagenizaron aleatoriamente CDR ejemplares y se evaluaron para determinar la capacidad de unirse a IgE. Cada aminoácido en CDR1 (SEQ ID NO: 3), CDR2 (SEQ ID NO: 68) y CDR3 (SEQ ID NO: 74) se reemplazó aleatoriamente de modo que los 20 aminoácidos naturales probablemente se habrían muestreado en cada posición. El vector de expresión para el VHH que contenía las CDR mutagenizadas se transfectó luego en E. coli, y se eligieron al menos 96 clones al azar para cada posición mutada en cada CDR. Esto proporciona una cobertura

probable de todas las mutaciones potenciales en cada posición, ya que la probabilidad de obtener cualquier aminoácido dado en esa posición es del 5 %. Cada clon se lisó y el lisado se analizó para determinar la unión a la IgE unida a la placa mediante ELISA. Los mapas de calor representan la unión relativa para cada clon determinada por el rango de valores de OD del fondo de ELISA a la unión de CDR WT (Figura 16A-16C). La numeración del sitio para cada residuo analizado se indica mediante las tablas insertadas en las Figuras 16A-16C. Las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida completa de la unión se indican con un "*", las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida casi completa de la unión se indican con "^", y las posiciones donde los cambios llevaron a la pérdida parcial de la unión se indican con "!".

Los clones que tenían una unión igual o mayor con respecto a las CDR VHH B10 originales se secuenciaron, y la afinidad de unión se verificó dos veces más.

[00237] El análisis de los resultados de ELISA para la detección de CDR1 (Figura 16A) demostró que los cambios en los sitios 1 y 7 de la SEQ ID NO: 3 condujo a una pérdida completa de la unión a IgE, y un cambio en el sitio 2 condujo a una pérdida casi completa de la unión a IgE. La alteración de los residuos 4 y 10 de la SEQ ID NO:3 condujo a una pérdida de unión parcial. La mutación de la mayoría de los residuos de CDR2 tuvo poco efecto sobre la unión a IgE (Figura 16B). Sin embargo, la alteración del sitio 3 de la SEQ ID NO: 68 condujo a una pérdida parcial de unión con IgE. Para CDR3 (SEQ ID NO: 74), los cambios en los sitios 3, 4, 9, 10 y 14 condujeron a una pérdida casi completa de la unión a IgE (Figura 16C). Se observó una pérdida parcial de la unión a IgE con la alteración de los sitios 1, 2, 7, 11, 15 y 16 de la SEQ ID NO: 74.

[00238] Estos datos muestran que CDR2 tiene una interacción mínima o nula con IgE, ya que casi todos los cambios de aminoácidos fueron bien tolerados. Por lo tanto, la unión de VHH de hzB10v40 a IgE se dicta principalmente a través de los residuos en CDR1 y CDR3, en los que la mutación de determinados residuos conduce a la pérdida de la unión de IgE.

[00239] Las mutaciones seleccionadas en CDR1 y CDR3 que retuvieron la unión de VHH a IgE se muestran en las Figuras 16D y 16E, respectivamente. Las secuencias de CDR de consenso se crearon en función de estas mutaciones, como se establece en la Tabla 2D *supra*. La Tabla 2D no incluye las secuencias de consenso de CDR1 bajo la definición de Kabat, Chothia o IMGT, dado que las secuencias de CDR1 bajo estas definiciones no incluyen toda la posición invariante correspondiente al sitio 1 de la SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 12: Unión y bloqueo de hzB10v40-IgG1 SELF con IgE y FCERII/CD23

[00240]

La capacidad de un sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v40-IgG1 SELF Fc (cx13054), para interactuar con IgE humana que estaba precomplejada con el FceRII/CD23 de baja afinidad en la superficie de las células RPMI 8866 se evaluó mediante citometría de flujo. Además, la capacidad del sdAb anti-IgE basado en VHH B10 representativo, hzB10v40-IgG1 SELF Fc (cx13054) para bloquear la unión de IgE soluble a CD23 en la superficie de las células RPMI 8866 se evaluó mediante citometría de flujo. Las células RPMI 8866 son una línea celular linfoblastoide de células B que expresa FceRII en la superficie celular pero carecen de FCERIA y son un modelo in vitro útil para evaluar las interacciones de IgE con CD23. La capacidad de las moléculas comparadoras anti-IgE cx10759 y cx10710 para interactuar/bloquear la IgE soluble también se examinó en estos estudios. Para evaluar la unión a IgE precomplejada con CD23, se mezclaron ~10 millones de células RPMI 8866 (ECACC Cat# 95041316) con IgE humana 10 nM (Abcam Cat# ab65866) y se incubaron durante la noche en medio completo a 37 °C, 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se lavaron con amortiguador FACS (Tris-Cl 50 mM, NaCl 150 mM, suero bovino fetal al 1 %, azida de sodio al 0,02 %, pH 7,6) para eliminar cualquier IgE soluble no unida restante. Las células lavadas se diluyeron a $0,8 \times 10^6$ células/mL. 50 µL de esta suspensión celular se transfirieron luego a los pocillos de una placa de ensayo de 96 pocillos de fondo redondo (40 k células/pocillo). Se agregaron 50 µL de artículos de prueba titulados (diluidos a 1 uM y titulados a través de 1:3 en amortiguador FACS) a las células RPMI 8866 que produjeron una dilución de 2 veces de las concentraciones de anticuerpo de la serie de titulación. La concentración inicial final fue de 500 nM con un total de 11 puntos en la titulación. Después de una incubación de 30 minutos con las titulaciones del artículo de prueba, las células RPMI 8866 se lavaron en amortiguador FACS y se tiñeron con Alexa Fluor® 647 AffiniPure Donkey Anti-Human IgG, específico del fragmento Fcγ (Jackson Cat# 709-605-098) diluido 1:6.000 en amortiguador FACS. Las células se incubaron con anticuerpos de detección secundarios durante 20 minutos, luego se lavaron una vez, se resuspendieron en 60 µL de amortiguador FACS y se analizaron en un citómetro de flujo NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, Inc.). La fluorescencia media de la señal 647 se calculó utilizando el software de activación a bordo Novoexpress en células RPMI8866 individuales. Las curvas de unión, los valores de B_{máx} y K_d se determinaron utilizando métodos similares a los descritos en el Ejemplo 1. Estos datos no se restaron del fondo antes de someterse al

análisis de ajuste de curva. La señal de fondo derivada empíricamente (sin tratamiento) debido a una unión de anticuerpo de detección secundaria se incluye en los datos graficados (Figura 17A) para referencia.

[00241] Como se representa en la Figura 17A, cx13054 unido con alta afinidad a IgE en complejo con CD23 en la superficie de células RPMI 8866. Los anticuerpos comparadores cx10759 y cx10710 demostraron una afinidad ligeramente reducida y valores de Bmax sustancialmente más bajos, lo que indica una interacción disminuida con los complejos IgE:CD23. Sin estar ligado a la teoría, la señal robusta general sugiere que el anticuerpo basado en B10 se une a IgE fuera del sitio de unión a CD23.

[00242] Para evaluar el bloqueo de la IgE soluble de la unión a CD23 en la superficie de las células RPMI 8866, se preincubó IgE humana 5 nM (Abcam Cat# 65866) con una titulación de cx13054 diluido (1:3 por duplicado con una concentración inicial final de 500 nM) en amortiguador FACS. Después de una incubación a temperatura ambiente de 1 hora, se agregaron 100 µL de la mezcla cx13054:IgE por duplicado a la línea celular linfoblastoide de células B que expresa CD23, RPMI 8866. Después de la incubación durante 1 hora, las células RPMI 8866 se lavaron y se determinó la unión a IgE usando un anticuerpo IgE anti-humano de conejo (Invitrogen Cat# SA5-10201) seguido de tratamiento con IgG anti-conejo de cabra conjugada con Alexa Fluor 647 (Jackson Cat#111-606-046). Se calculó la intensidad de fluorescencia de IgE media y se graficó frente a la concentración de cx13054. Los datos se trazaron usando el software de análisis GraphPad Prism. Estos datos no se restaron del fondo antes de someterse al análisis de ajuste de curva. La señal máxima promedio de los pocillos no tratados con cx13054 se indica como "IgE 5 nM" en los datos graficados (Figura 17B) para referencia.

[00243] Como se representa en la Figura 17B cx13054 bloqueó la unión de IgE a concentraciones molares iguales y superiores a las de IgE. A concentraciones de cx13054 por debajo de una relación molar 1:1 con respecto a IgE, se observó un aumento posterior de IgE unida a la superficie de las células RPMI 8866. Este aumento excedió el nivel de IgE que se observó en ausencia de cx13054, lo que indicó que se estaba reclutando IgE adicional a la superficie celular en presencia de niveles bajos de cx13054. Este fenómeno también se observó cuando se analizó la capacidad de cx13054 para bloquear la unión de IgE a CD23 recombinante (Figura 6E y datos no mostrados), lo que sugiere que la tendencia no se debe a la interacción

con los receptores Fc expresados en las células RPMI 8866. Sin limitarse a ningún mecanismo particular, es posible que el anticuerpo basado en B10 se una a IgE soluble para formar complejos oligoméricos que tienen la capacidad de unirse a CD23 una vez que la concentración de anticuerpo cae por debajo de una relación molar de 2:1, lo que expone un sitio de unión a CD23 libre en IgE. La unión de dichos complejos de IgE a CD23 puede regular negativamente la IgE a través de la regulación de retroalimentación negativa mediada por CD23 de la síntesis de IgE en células B.

Ejemplo 13: Inhibición in vitro de células B

[00244] La capacidad de dos sdAb anti-IgE a base de VHH de B10 que comprenden el VHH de hzB10v40 pero que tienen diferentes regiones Fc (cx13054, que comprende la región Fc SELF de IgG1 (SEQ ID NO: 79) y cx13055 que comprende la región Fc de xELL de IgG1 (SEQ ID NO: 77)) para inhibir la producción de IgE por las células B se evaluó en un ensayo in vitro. Un análogo de omalizumab (Evidentic Cat. n.º AVXS262503) se incluyó como comparador.

[00245] La configuración experimental se adaptó de Chu et al. (J. Allergy Clin. Immunol. (2012) 129(4):1102-15). Las PBMC de donantes de sangre normales sanos se descongelaron del almacenamiento de nitrógeno líquido y se lavaron con suplemento de CTL (x2), luego se colocaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 3 millones de células vivas/pocillo en 1 ml. La producción de anticuerpos IgE se estimuló mediante la incubación de células B en medio RPMI-1640 complementado con 5 ng/mL de IL-4 humana recombinante (PeproTech AF-200-04) y 250 ng/mL de anticuerpo anti-CD40 (R&D Systems MAB6321-SP). Se incluyó un grupo de control "sin estimulación" en cada placa de ensayo. Se agregaron 10 µL de artículos de prueba para una concentración final de 10 nM, 1 nM y 0,1 nM en las 3 placas por duplicado y las placas de ensayo se incubaron a 37 °C/CO₂ durante 14 días hasta la cosecha. El día 15, los sobrenadantes se recogieron y centrifugaron para eliminar las células/residuos, luego se congelaron a -80°C hasta el análisis. Para el análisis, el protocolo de ensayo singleplex MSD R-PLEX 1, como se proporciona en el inserto del producto, se aplicó al kit de prueba de IgE humana (K1515AR-2), excepto que se seleccionó el anticuerpo policlonal de cabra anti-Human IgE Cross-Adsorbed (Thermo Cat# A18801) como el anticuerpo de detección porque no compitió por el mismo epítipo de IgE que los artículos de prueba en el experimento. Este anticuerpo se conjugó de acuerdo con el protocolo MSD GOLD SULFO-TAG NHS-Ester Conjugation Pack (Cat# R31AA-1). Las muestras se analizaron a una dilución final de 1:2.

- [00246]** Como se muestra en la Figura 18, cx13054, que comprendía la región Fc SELF de IgG1, inhibió la producción de IgE de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, cx13055, que comprendía la región Fc xELL de IgG1, y omalizumab, que comprendía una región Fc de IgG1 de tipo silvestre, exhibieron poca o ninguna inhibición. Estos datos respaldan el uso
- 5 de un sdAb basado en VHH B10 fusionado con la región Fc SELF para inhibir la producción de IgE a partir de células B. También se observó que cx13054 no inhibió la producción de otros tipos de inmunoglobulinas, tales como IgD, a partir de un cultivo de células B (datos no mostrados). Este resultado demuestra que cx13054 se dirige específicamente a las células B productoras de IgE.
- 10 **[00247]** La descripción puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o las características esenciales de la misma. Por lo tanto, las modalidades anteriores deben considerarse en todos los aspectos ilustrativas en lugar de limitantes de la descripción. Por lo tanto, el alcance de la descripción está indicado por las reivindicaciones adjuntas en lugar de
- 15 por la descripción que antecede, y se pretende que todos los cambios que se encuentren dentro del significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones estén comprendidos en la presente.

Tabla de determinadas secuencias

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
1	IgE humana, cadena pesada, GenBank AAB59424,1	MDWTWILFLVAAATRVHSQTQLVQSGAEVRKPGASVRVSCA SGYTFIDSYIHWIRQAPGHGLEWVGWINPNSGGTNYAPRFQG RVTMTRDASFSTAYMDLRSLRSDDSAVFYCAKSDPFWSDDYYN FDYSYTLDVWGQGTTVTVSSASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNAT SVTLGCLATGYFPEPVMVTWDTGSLNGTTMTLPATTLTSLGHY ATISLLTVSGAWAKQMFTCRVAHTPSSTDWVDNKTFSVCSRDF TPPTVKILQSSCDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDG QVMDVDLSTASTTQEGELASTQSELTLSQKHWLSDRTYTCQV TYQGHTFEDSTKKCADSNPRGV SAYLSRPSPFDLFIRKSPTITC LVVDLAPSKGTVNLTWSRASGKPVNHSTRKEEKQRNGTLTVTS TLPVGTRDWIEGETYQCRVTHPHLPRALMRSTTKTSGPRAAPE

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		VYAFATPEWPGSRDKRTLACLIQNFMPEDISVQWLHNEVQLPD ARHSTTQPRKTKGSGFFVFSRLEVTRAWEQKDEFICRAVHEA ASPSQTVQRAVSVNPGK
2	B10 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
3	B10 CDR1	GLTFSSYNMG
4	B10 CDR2	MSGSSSTSTY
5	B10 CDR3	RRMLSTYWSDRSWDF
6	hzB10v1 VHH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAPG KEREFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNS LKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
7	hzB10v2 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFVMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
8	hzB10v3 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
9	hzB10v4 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGMSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
10	hzB10v5 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
11	hzB10v6 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVRP
12	hzB10v7 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		GKEREFFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
13	hzB10v8 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGISGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
14	hzB10v9 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGVS GSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
15	hzB10v10 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTAKP
16	hzB10v11 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRILSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
17	hzB10v12 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGMSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRVLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
18	hzB10v13 VHH	EVQLVQSGGELVQAGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGMSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTAKP
19	hzB10v14 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
20	hzB10v15 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFFVSLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
21	hzB10v16 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
22	hzB10v17 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
23	hzB10v18 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADTVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
24	hzB10v20 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
25	hzB10v21 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMS SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
26	hzB10v22 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
27	hzB10v23 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
28	hzB10v24 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
29	hzB10v25 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVSLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
30	hzB10v26 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGMSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAARRMLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVKP
31	hzB10v27 VHH	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
32	hzB10v28 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMS SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
33	hzB10v29 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMQ SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
34	hzB10v30 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
35	hzB10v31 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN TLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
36	hzB10v32 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
37	hzB10v33 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVSLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
38	hzB10v34 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWVRQAP GKEREFVSLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEP
39	hzB10v37 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMT SLKAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT LVTVEP
40	hzB10v38 VHH	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN SKNTVYLQMT SLRPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT LVTVEP

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
41	hzB10v39 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN ^{SKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
42	hzB10v40 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN ^{AKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
43	hzB10v41 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISR ^{DQSKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
44	hzB10v42 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISR ^{DSSKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
45	hzB10v43 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISR ^{DTSKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
46	hzB10v44 VHH	EVQLLES ^{GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP} GKREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISR ^{DNTKNTVYLQMT} SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT ^{LTVEP}
47	hzB10con VHH	EVQL ^{X₁X₂} SGG ^{X₃X₄} VQ ^{X₅} GGSLRLSCVASGLTFSSYNMGW ^{X₆} R QAPGKREFV ^{X₇X₈} SGSSSTSTYYA ^{X₉X₁₀} VKGRFTISR ^{D_{X₁₁X₁₂}K} NT ^{X₁₃} YLQM ^{X₁₄X₁₅} L ^{X₁₆X₁₇} EDTAVYYCAARR ^{X₁₈} LSTYWSDRSW DFWGQGT ^{X₁₉} VT ^{X₂₀X₂₁} P en donde: X ₁ es L o V X ₈ es L, I, V o M X ₁₅ es S o T X ₂ es E o Q X ₉ es E o D X ₁₆ es R o K X ₃ es G o E X ₁₀ es S, A o T X ₁₇ es A o P X ₄ es E o L X ₁₁ es N, Q, S o T X ₁₈ es L, I, V o M X ₅ es P o A X ₁₂ es S, A o T X ₁₉ es L o Q X ₆ es L o V X ₁₃ es V o L X ₂₀ es V o A

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		X ₇ es G o S X ₁₄ es T, N, S o Q X ₂₁ es E, K o R
48	hzB10v7, v14- v18, v20-v25, v27-v34 y v37- v44 CDR2	LSGSSSTSTY
49	hzB10v8 CDR2	ISGSSSTSTY
50	hzB10v9 CDR2	VSGSSSTSTY
51	hzB10v10, v14- v18, v20-v25, v27-v34 y v37- v44 CDR3	RRLLSTYWSDRSWDF
52	hzB10v11 CDR3	RRILSTYWSDRSWDF
53	hzB10v12 CDR3	RRVLSTYWSDRSWDF
54	hzB10con CDR1 Chothia	GLTFSSY
55	hzB10con CDR1 Kabat	SYNMG
56	hzB10con CDR1 Contacto	SSYNMG
57	hzB10con CDR1 IMGT	LTFSSYN

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
58	hzB10con CDR2 Abm	<u>X</u> SGSSSTSTY en donde: X es L, I, V o M
59	hzB10con CDR2 Chothia	GSSSTS
60	hzB10con CDR2 Kabat	<u>X</u> ₁ SGSSSTSTYYA <u>X</u> ₂ <u>X</u> ₃ VKG en donde: X ₁ es L, I, V o M; X ₂ es E o D; y X ₃ es: S, A o T
61	hzB10con CDR2 Contacto	FV <u>X</u> ₁ <u>X</u> ₂ SGSSSTSTY en donde: X ₁ es G o S; y X ₂ es L, I, V o M
62	hzB10con CDR2 IMGT	SGSSSTST
63	hzB10con CDR3 Abm	RR <u>X</u> LSTYWSDRSWDF en donde: X es L, I, V o M
64	hzB10con CDR3 Chothia	RR <u>X</u> LSTYWSDRSWDF en donde: X es L, I, V o M
65	hzB10con CDR3 Kabat	RR <u>X</u> LSTYWSDRSWDF en donde: X es L, I, V o M
66	hzB10con CDR3 Contacto	AARR <u>X</u> LSTYWSDRSWD en donde: X es L, I, V o M
67	hzB10con CDR3	AARR <u>X</u> LSTYWSDRSWDF en donde: X es L, I, V o M

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	IMGT	
68	hzB10v37-v44 CDR2 Kabat	LSGSSSTSTYYAESVKG
69	hzB10v37-v44 Contacto CDR2	FVGLSGSSSTSTY
70	hzB10v37-v44 CDR2 IMGT	SGSSSTST
71	hzB10v37-v44 CDR3 Chothia	RRLLSTYWSDRSWDF
72	hzB10v37-v44 CDR3 Kabat	RRLLSTYWSDRSWDF
73	hzB10v37-v44 Contacto CDR3	AARRLLSTYWSDRSWD
74	hzB10v37-v44 CDR3 IMGT	AARRLLSTYWSDRSWDF
75	Región Fc de IgG1 humana	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
76	Región Fc de IgG1 humana (sin lisina terminal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVW DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
77	igG1 Fc xELL humano	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
78	xELL de Fc de IgG1 humana (sin lisina terminal)	DKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
79	Región Fc SELF de IgG1 humana (S267E/L328F)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
80	Región Fc SELF de IgG1 humana (S267E/L328F) (sin lisina terminal)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
81	Región Fc de DSELF de IgG1 humana (G236D/S267E /L328F)	DKTHTCPPCPAPELLDGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		HYTQKSLSLSPGK
82	Región Fc de DSELF de IgG1 humana (G236D/S267E /L328F) (sin lisina terminal)	DKTHTCPPCPAPELLDGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
83	IgG1 NNT Fc humano	GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVNL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLNSTLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
84	región Fc DSELF de hzB10v14-IgG1 (cx12739)	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAPGKEREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEPGGGGDKTHTCPPCPAPELLDGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
85	región Fc DSELF de hzB10v40-IgG1 (cx13032)	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAPGKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTVY LQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT LVTVEPGGGGDKTHTCPPCPAPELLDGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		ALHNHYTQKSLSLSPGK
86	región Fc SELF de hzB10v40- IgG1 (cx13054)	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTLVTVEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
87	cx10710 Cadena pesada	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSGYSWNWIRQPPG KKLEWIGSITYDGSSNYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGAGTLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
88	cx10710 Cadena ligera	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSV DYGDSYMNWYQQ KPGQPPKLLIYAASYLGSEIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF ATYYCQQSHEDPYTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
89	cx10759 (IgE026-IgG	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFGNYDMAWVRQAP GKRPEWVSSIDTGGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMS

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	humanizado SELF Fc)	SLRAEDTAVYWCATDEEYALGPNEFDYYGGTGLVTVKPGGGG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
90	FCER1A humano (maduro)	VPQKPKVSLNPPWNRIFKGENVTLCNGNNFFEVSSTKWFHN GSLSEETNSSLNIVNAKFEDSGEYKCQHQQVNESEPVYLEVFS DWLLLQASAEVVMEGQPLFLRCHGWRNWDVYKVIYYKDGEAL KYWYENHNISITNATVEDSGTYCTGKVVQLDYESEPLNITVIK APREKYWLQFFIPLLVLFAVDTGLFISTQQQVTFLLIKRTKRG FRLLNPHPKPNPKNN
91	Enlazador	GGGG
92	región Fc DSELF de hzB10v40-IgG1 (cx13032) (sin lisina de extremo C)	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTGLVTEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLDGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
93	región Fc SELF de hzB10v40- IgG1 (cx13054) (sin lisina de extremo C)	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDNANTVYLQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTGLVTEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPRE

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
		PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
94	Secuencia de línea germinal humana VH3- 23	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMS SLRAEDTAVYYC
95	región Fc SELF de hzB10v14- IgG1 ("739")	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKREFVGLSGSSSTSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGTQVTVEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
96	Ligelizumab VH	QVQLVQSGAEVMKPGSSVKVSCKASGYTFSWYWLEWVRQAP GHGLEWMGEIDPGTFTTNYNEKFKARVTFTADTSTSTAYMELS SLRSEDVAVYYCARFSHFSGSNYDYFDYWGQGTTLTVSS
97	Ligelizumab VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQA PRLLIYYASESISGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYC QQSWSWPTTFGGGTKVEIK
98	8D6 VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFNGYWMHWVRQAP GQGLEWIGYINPTTGHTEYNQKFKDKATITADESTNTAYMELSS LRSEDVAVYYCARQEYRHSWFAYWGQGTTLTVSS
99	8D6 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSVDDYDGDYMNWYQQ KPGKAPKLLIYAASNLD SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQTNEDPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
100	región Fc de hzB10v40-IgG1 xELL (cx13055)	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGSSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTVYLQMT SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSDRSWDFWGQGT LVTVEPG GGGDKTHTCPPCPAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
101	hzB10v40,52	EVQLLES GGGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGVSSTSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTGYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSHRSWDFWGQGT LVTVEP
102	hzB10v40,52 CDR2 (AbM)	LSGVSSTSTY
103	hzB10v40,52 CDR3 AbM	RRLLSTYWSHRSWDF
104	hzB10con-1 CDR2 AbM	X ₁ SGX ₂ SSTSTY en donde: X ₁ es L, I, V o M; y X ₂ es S o V
105	hzB10con-1 CDR2 Chothia	GXSSTS en donde: X es S o V
106	hzB10con-1 CDR2 Kabat	X ₁ SGX ₂ SSTSTYYAX ₃ X ₄ VKG en donde: X ₁ es L, I, V o M; X ₂ es S o V; X ₃ es E o D; y X ₄ es: S, A o T
107	contacto hzB10con-1 CDR2	FVX ₁ X ₂ SGX ₃ SSTSTY en donde: X ₁ es G o S; X ₂ es L, I, V o M; y X ₃ es S o V
108	hzB10con-1 CDR2 IMGT	X ₁ SGX ₂ SSTSTY en donde: X ₁ es L, I, V o M; y X ₂ es S o V
109	hzB10con-1	RRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
	CDR3 AbM, Chothia, Kabat	en donde: X ₁ es L, I, V o M; y X ₂ es D o H
110	contacto hzB10con-1 CDR3	AARRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWD en donde: X ₁ es L, I, V o M; y X ₂ es D o H
111	hzB10con-1 CDR3 IMGT	AARRX ₁ LSTYWSX ₂ RSWDF en donde: X ₁ es L, I, V o M; y X ₂ es D o H
112	hzB10v40,52- IgG1-SELF (cx13784)	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGVSSTSTYYAESVKGRFTISRDNANTGYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSHRSWDFWGQGT LVTVEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
113	hzB10v40,52- IgG1-SELF (cx13784) (sin lisina C- terminal)	EVQLLES GGGEVQPGGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWLRQAP GKEREFVGLSGVSSTSTYYAESVKGRFTISRDNANTGYLQMN SLRAEDTAVYYCAARRLLSTYWSHRSWDFWGQGT LVTVEPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
114	hzB10v40 variantes consenso CDR1 AbM	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ YX ₆ X ₇ X ₈ en donde X ₁ es L, I o V; X ₂ es T, V, N, K o I; X ₃ es F, Y, P o G; X ₄ es S, K, A, D o R; X ₅ es S, E, Q, T, R, A o P; X ₆ es N, T, S o R; X ₇ es M, V, I, L, S, T o F; y X ₈ es G, S o A

SEQ ID NO	Descripción	Secuencia
115	hzB10v40 variantes consenso CDR1 Chothia	GX ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ Y en donde X ₁ es L, I o V; X ₂ es T, V, N, K o I; X ₃ es F, Y, P o G; X ₄ es S, K, A, D o R; y X ₅ es S, E, Q, T, R, A o P
116	variantes hzB10v40 consenso CDR3 AbM, Kabat, Chothia	RRX ₁ X ₂ SX ₃ YWSX ₄ RSWDX ₅ en donde X ₁ es L o R; X ₂ es L, K, F o H; X ₃ es T o R; X ₄ es D, M o H; y X ₅ es F, K o M
117	hzB10v40 variantes consenso CDR3 IMGT	X ₁ ARRX ₂ X ₃ SX ₄ YWSX ₅ RSWDX ₆ en donde X ₁ es A o S; X ₂ es L o R; X ₃ es L, K, F o H; X ₄ es T o R; X ₅ es D, M o H; y X ₆ es F, K o M
118	hzB10v40 variantes consenso CDR3 Contacto	X ₁ ARRX ₂ X ₃ SX ₄ YWSX ₅ RSWD en donde X ₁ es A o S; X ₂ es L o R; X ₃ es L, K, F o H; X ₄ es T o R; y X ₅ es D, M o H
119	hzB10con1 VHH	EVQLX ₁ X ₂ SGGX ₃ X ₄ VQX ₅ GGSLRLSCVASGLTFSSYNMGWX ₆ R QAPGKEREFVX ₇ X ₈ SGX ₉ SSTSTYYAX ₁₀ X ₁₁ VKGRFTISRDX ₁₂ X ₁₃ KNTX ₁₄ YLQMX ₁₅ X ₁₆ LX ₁₇ X ₁₈ EDTAVYYCAARRX ₁₉ LSTYWSX ₂₀ RS WDFWGQGTX ₂₁ VTX ₂₂ X ₂₃ P en donde: X ₁ es L o V; X ₂ es E o Q; X ₃ es G o E; X ₄ es E o L; X ₅ es P o A; X ₆ es L o V; X ₇ es G o S; X ₈ es L, I, V o M; X ₉ es S o V; X ₁₀ es E o D; X ₁₁ es S, A o T; X ₁₂ es N, Q, S o T; X ₁₃ es S, A o T; X ₁₄ es V, G o L; X ₁₅ es T, N, S o Q; X ₁₆ es S o T; X ₁₇ es R o K; X ₁₈ es A o P; X ₁₉ es L, I, V o M; X ₂₀ es D o H; X ₂₁ es L o Q; X ₂₂ es V o A; y X ₂₃ es E, K o R