

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 088**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2004** **E 04759444 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **18.01.2006** **EP 1615955**

54 Título: **Alternación de las afinidades de unión por FCRN o de las simividas en suero de los anticuerpos mediante mutagénesis**

30 Prioridad:

10.04.2003 US 462014 P

03.06.2003 US 475762 P

29.08.2003 US 499048 P

15.10.2003 US 687118

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2013

73 Titular/es:

ABBOTT BIOTHERAPEUTICS CORP. (100.0%)

1500 Seaport Boulevard

Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

HINTON, PAUL R.;

TSURUSHITA, NAOYA;

TSO, J. YUN y

VASQUEZ, MAXIMILIANO

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 394 088 T3

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

DESCRIPCIÓN

Alternación de las afinidades de unión por FcRn o de las semividas en suero de los anticuerpos mediante mutagénesis

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a los campos de la inmunología y de la ingeniería proteica. En particular, se refiere a anticuerpos modificados de clase IgG que tienen alteradas las afinidades de unión por FcRn o alteradas las semividas en suero como consecuencia de una o más modificaciones de aminoácidos en la región Fc de los mismos.

Antecedentes de la invención

- 10 Los anticuerpos son proteínas que exhiben especificidad de unión por un antígeno concreto. Los anticuerpos nativos (es decir, de aparición natural o de tipo salvaje) normalmente son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Como se muestra en la Figura 1, cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina varía. Cada cadena pesada tiene, en un extremo, un dominio variable (V_H) seguido por una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en el otro extremo. El dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada.

- 20 Ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y son responsables de la especificidad de unión de cada anticuerpo concreto a su antígeno concreto. Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de las cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales (isotipos) de inmunoglobulinas en seres humanos: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de éstas pueden además dividirse en subclases (subtipos), tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, así como IgA1 e IgA2.

- 25 Una representación esquemática de la estructura de IgG nativa se muestra en la Figura 1, en la que están indicadas las diversas porciones de la molécula de anticuerpo nativo. La región constante de la cadena pesada incluye C_H1 , la región bisagra, C_H2 , y C_H3 . La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos, Fab y Fc. El fragmento Fc consiste en C_H2 , C_H3 , y parte de la región bisagra. Se ha determinado la estructura cristalina del fragmento Fc de la IgG1 humana (Deisenhofer, Biochemistry 20:2361-2370 (1981)). En las moléculas de IgG humanas, el fragmento Fc se genera mediante escisión con papaína de la región bisagra N-terminal a Cys 226. Por tanto, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana normalmente se define como la extensión desde el residuo de aminoácido en la posición 226 al extremo C (numerado de acuerdo con el índice de la UE de Kabat, y col., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991); en lo sucesivo en el presente documento se usa el esquema de numeración de la UE).

- 30 La región Fc es esencial para las funciones efectoras de los anticuerpos. Las funciones efectoras incluyen iniciar la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), iniciar la fagocitosis y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (AD-CC) y transferir los anticuerpos a través de las barreras celulares mediante transcitosis. Además, la región Fc es crucial para mantener la semivida en suero de un anticuerpo de clase IgG (Ward y Ghetie, Ther. Immunol. 2:77-94 (1995)).

- 35 En los estudios se ha descubierto que la semivida sérica de un anticuerpo IgG está mediada por la unión de Fc al receptor de Fc neonatal (FcRn). El FcRn es un heterodímero que consiste en una cadena α transmembrana y una cadena β soluble ($\beta 2$ -microglobulina). El FcRn comparte un 22-29% de identidad de secuencia con las moléculas de MHC de clase I y tiene una versión no funcional de la ranura de unión péptido-MHC (Simister y Mostov, Nature 337:184-187 (1989)). Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de FcRn interaccionan con los dominios C_H2 y C_H3 de la región Fc (Raghavan y col., Immunity 1:303-315 (1994)).

- 40 Se ha propuesto un modelo de cómo FcRn podría regular la semivida sérica de un anticuerpo. Como se muestra en la Figura 2, las IgG son captadas por las células endoteliales a través de pinocitosis no específica y, después, entran en los endosomas ácidos. FcRn se une a IgG a un pH ácido (<6,5) en los endosomas y liberan IgG a un pH básico (> 7,4) en la corriente sanguínea. De acuerdo con esto, la FcRn salva a la IgG de una vía de degradación lisosomal. Cuando los niveles de IgG en suero disminuyen, se dispone de más moléculas de FcRn para la unión a IgG de modo que se salva un incremento de la cantidad de IgG. Por el contrario, si los niveles de IgG en suero aumentan, el FcRn se satura y, de este modo, se incrementa la proporción de IgG pinocitosada que se degrada

(Ghetie y Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766 (2000)).

Consistente con el modelo anterior, los resultados de numerosos estudios avalan una correlación entre la afinidad de la unión de FcRn y la semivida en suero de un anticuerpo (Ghetie y Ward, *ibid.*). Es significativo el hecho de que dicha correlación se ha extendido a anticuerpos sometidos a ingeniería con mayor afinidad por FcRn que sus moléculas parentales de tipo salvaje.

Ghetie et al. realizaron una mutagénesis aleatoria en la posición 252, la posición 254 y la posición 256 en un fragmento de bisagra de Fc de IgG1 de ratón. Un mutante mostró una afinidad tres veces y media superior para la FcRn de ratón y una semivida de aproximadamente 23% o 65% mayor en dos cepas de ratón, respectivamente, en comparación con las del tipo salvaje (Ghetie y col., *Nat. Biotechnol.* 15:637-640 (1997)).

Shields y col. usaron mutagénesis de barrido con Alanina para alterar los residuos en la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano y, después, evaluaron la unión a FcRn humano. Encontraron varios mutantes con una afinidad de unión mayor por FcRn humano que el tipo salvaje, pero no identificaron mutaciones en las posiciones 250, 314 o 428 (Shields y col., *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604 (2001)).

Martin y col. propusieron la mutagénesis en una serie de posiciones en la Fc de la IgG humana para incrementar la unión a FcRn, incluidas, entre muchas otras, las posiciones 250, 314 y 428. No obstante, ninguno de los mutantes propuestos por Martin y col. se construyó o analizó según su unión a FcRn (Martin y col., *Mol. Cell* 7:867-877 (2001)).

Dall'Acqua et al. han descrito la mutagénesis aleatoria y detección selectiva de bibliotecas de expresión en fagos del fragmento Fc-bisagra de IgG1 humana frente al FcRn de ratón. Divulgaron la mutagénesis aleatoria de las posiciones 428-436, pero no identificaron que la mutagénesis en la posición 428 tuviera ningún efecto sobre la afinidad de unión a FcRn de ratón e indicaron que el aminoácido salvaje, metionina, en esta posición es favorable a una unión eficaz (Dall'Acqua y col., *J. Immunol.* 169:5171-5180 (2002)).

Kim y col. realizaron mutagénesis en la IgG1 humana mediante sustituciones de aminoácidos en la posición 253, la posición 310 o la posición 435 de la región Fc. Encontraron que los fragmentos mutantes de Fc-bisagra tienen semividas reducidas en ratones en comparación con el fragmento Fc-bisagra de IgG1 salvaje y concluyeron que Ile253, His310 y His435 desempeñan un papel fundamental en la regulación de la semivida en suero de IgG (Kim y col., *Eur. J. Immunol.* 29:2819-2825 (1999)).

Hornick y col. mostraron que una sustitución de un único aminoácido en la posición 253 en la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano quimérico acelera el aclaramiento en ratones y mejora la inmunocentelleo de los tumores sólidos (Hornick y col., *J. Nucl. Med.* 41: 355-362 (2000)).

La patente de EE.UU. nº 6.165.745 divulga un procedimiento de producir un anticuerpo con una menor semivida biológica mediante la introducción de una mutación en el segmento de ADN que codifica el anticuerpo. La mutación incluye una sustitución de aminoácido en las posiciones 253, 310, 311, 433 ó 434 del dominio Fc-bisagra.

Las patentes de EE.UU. números 5.530.101; 5.585.89; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370 divulgan la humanización de inmunoglobulinas..

La patente de EE.UU. nº 6.277.357 B1 divulga una composición que comprende una molécula de IgG mutante que tiene una mayor semivida en suero con respecto a la IgG salvaje, en la que la molécula de IgG mutante comprende las sustituciones de aminoácidos: treonina a leucina en la posición 252, treonina a serina en la posición 254 o treonina a fenilalanina en la posición 256. También se divulga una IgG mutante con una sustitución de aminoácido en la posición 433, 435 o 436.

La publicación de solicitud de patente de EE.UU. US 20020098193 A1 y la publicación PCT Nº WO 97/34621 divulgan moléculas de IgG mutantes que tienen mayores semividas en suero respecto a la IgG en la que la molécula IgG mutante tiene al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc-bisagra. No obstante, no se proporciona ningún respaldo experimental para las mutaciones en las posiciones 250, 314 o 428.

La patente de EE.UU. Nº 6,528,624 divulga una variante de un anticuerpo que comprende una región Fc de IgG, en la que la variante comprende una sustitución de aminoácido en uno o más de las posiciones de aminoácido 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333, y 334 de la región Fc de IgG humana.

La publicación PCT nº WO 98/05787 divulga la delección o sustitución de aminoácidos en las posiciones 310-331 del anticuerpo BR96 con el fin de reducir su toxicidad inducida, pero no divulga modificaciones de aminoácidos que den lugar a alteración de la unión a FcRn.

La publicación PCT N° WO 00/42072 divulga un polipéptido que comprenden una región Fc variante con alteración de la afinidad de unión a FcRn, en el que el polipéptido comprende una modificación de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido 238, 252, 253, 254, 255, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 386, 388, 400, 413, 415, 424, 433, 434, 435, 436, 439, y 447 de la región Fc, en el que la numeración de los residuos de la región Fc es la del índice de la UE (Kabat y col., op. cit.)

La publicación PCT n° WO 02/060919 A2 divulga una IgG modificada que comprende un dominio constante de IgG que comprende una o más modificaciones de aminoácidos respecto a un dominio constante de IgG salvaje, en el que la IgG modificada tiene una mayor semivida en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de IgG salvaje, y en el que la una o más modificaciones de aminoácidos están en una o más de las posiciones 251, 253, 255, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-435. No obstante, no se divulgan ejemplos de mutaciones en las posiciones 314 o 428 con alteración de la unión a FcRn.

Martin, W.L. (Doctoral dissertation entitled, "Protein-Protein Recognition: The Neonatal Fc Receptor and Immunoglobulin G," California Institute of Technology (2001)) propone mutaciones teóricas en varias posiciones de Fc de la región constante de gamma-2a de rata, incluidas las posiciones 250 a 428, que pueden incrementar la afinidad de unión por FcRn. Martin sugiere la posibilidad de sustituir entre otros, isoleucina por valina en la posición 250 o sustituir fenilalanina por leucina en la posición 428. Martin no sugiere ninguna sustitución para la posición 314. Martin no demuestra un incremento de la afinidad de unión a FcRn para ninguna de estas mutaciones propuestas.

Las publicaciones a las que se hace referencia en lo que antecede no han mostrado que la semivida en suero o la afinidad de unión a FcRn de un anticuerpo de la clase IgG se pueda alterar mediante las modificaciones de aminoácidos en la posición 250, la posición 314 o la posición 428 de la región Fc. La presente invención ha usado modelación molecular para seleccionar residuos de Fc cerca del sitio de contacto de FcRn que podrían tener un efecto sobre la unión, pero no necesariamente tiene que ser unión dependiente de pH. Las modificaciones de aminoácidos se realizaron en las posiciones 250, 314 ó 428 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina de clase IGG. Las semividas en suero o las afinidades de unión a FcRn de los anticuerpos que comprenden dichas modificaciones se alteraron y, por tanto, eran diferentes de las de los anticuerpos no modificados.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo modificado de daclizumab que comprende ácido glutámico o glutamina en el residuo de aminoácido 250 y leucina o fenilalanina en el residuo de aminoácido 428 y en el que los residuos de aminoácidos están numerados por el sistema de numeración de UE para usar en profilaxis o terapia, en el que

(a) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina.

(b) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina; o

(c) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es leucina

La presente invención se basa en la identificación por los inventores de varias mutaciones en el dominio constante de una molécula de IgG humana que alteran (es decir, incrementan o disminuyen) la afinidad de la molécula de IgG por FcRn. La presente invención proporciona anticuerpos modificados que tienen alteradas la afinidad de unión a FcRn y/o la semivida sérica respecto a la del correspondiente anticuerpo no modificado. La semivida *in vivo* (es decir, la persistencia en suero u otros tejidos de un sujeto) de los anticuerpos, y otras moléculas bioactivas, es un importante parámetro clínico que determina la cantidad y la frecuencia de la administración de anticuerpo (o de cualquier otra molécula farmacéutica). De acuerdo con esto, dichas moléculas, incluidos los anticuerpos, con semivida incrementada (o disminuida) tienen una importancia farmacéutica significativa.

La presente divulgación se refiere a una molécula modificada (preferentemente un anticuerpo) que tiene una semivida incrementada (o disminuida) *in vivo* en virtud de la presencia de un dominio constante de IgG modificada (preferentemente de una IgG humana) o una porción de unión a FcRn del mismo (preferentemente, la Fc o el dominio Fc-bisagra), en la que el dominio constante de la IgG, o un fragmento del mismo, se modifica (preferentemente por una sustitución de aminoácido) para aumentar (o reducir) la afinidad por FcRn.

En concreto, la presente divulgación se refiere a anticuerpos de clase IgG modificados, cuyas semividas *in vivo* se han extendido (o reducido) mediante los cambios en los residuos de aminoácidos en las posiciones identificadas por los estudios estructurales para implicar directa o indirectamente en la interacción del dominio bisagra de Fc con el receptor FcRn. Preferentemente, el anticuerpo de clase IgG modificado se selecciona del grupo que consiste en

5

En formas de realización preferidas, el dominio constante (o un fragmento del mismo) tiene una afinidad mayor por FcRn a pH 6,0 que a pH 7,4. Es decir, la dependencia de pH de la afinidad de unión a FcRn imita a la dependencia de pH del tipo salvaje. En formas de realización alternativas, los anticuerpos modificados de la presente invención pueden exhibir perfiles de dependencia de pH alterados con respecto a los del anticuerpo no modificado. Dichos perfiles de dependencia de pH alterados pueden ser útiles en algunas aplicaciones terapéuticas o diagnósticas.

10

En algunas formas de realización, las modificaciones del anticuerpo de la presente invención alterarán la unión a FcRn y/o la semivida en suero sin alterar otras funciones efectoras del anticuerpo, como la ADCC o la CDC. En formas de realización particularmente preferidas, los anticuerpos modificados de la invención no exhiben cambios en la unión a los receptores Fc-gamma o C1q. En formas de realización alternativas, las modificaciones de anticuerpo de la presente invención pueden tener como resultado un incremento (o disminución) de las funciones efectoras, así como un incremento de la semivida en suero. En formas de realización particularmente preferidas, los anticuerpos modificados de la invención pueden tener actividades incrementadas (o disminuidas) ADCC, así como un incremento de la semivida incrementada en suero.

15

Cabe indicar que las modificaciones de la presente invención también pueden alterar (es decir, incrementar o disminuir) la biodisponibilidad (p. ej., el transporte a las superficies mucosas u otros tejidos diana) de los anticuerpos modificados (u otras moléculas).

20

La presente divulgación proporciona un anticuerpo modificado de clase IgG, en el que al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 está sustituido por un residuo de aminoácido diferente del presente en el anticuerpo no modificado. Preferentemente, esta sustitución altera la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo modificado con respecto al anticuerpo salvaje no modificado. La presente invención además proporciona un anticuerpo modificado que tiene una mayor afinidad de unión por FcRn y un incremento de la semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico o glutamina; y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina o leucina.

25

30

La presente invención además proporciona un anticuerpo modificado que tiene una mayor afinidad de unión por FcRn y/o mayor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que (a) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina; (b) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina; o (c) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con leucina.

35

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y/o menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con otro aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado.

40

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y/o menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con arginina, asparagina, ácido aspártico, lisina, fenilalanina, prolina, triptófano o tirosina, o el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina o valina.

45

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica a una región constante de anticuerpo de clase IgG natural, en la que al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 250, 314 y 428 es diferente del presente en el anticuerpo de clase IgG natural, de modo que altera la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo respecto al anticuerpo natural. En formas de realización preferidas, el anticuerpo de clase IgG natural comprende una región constante de la cadena pesada de una molécula de IgG1, IgG2, IgG2M3, IgG3 o IgG4 humana.

50

Asimismo, en formas de realización preferidas, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada del anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica al anticuerpo de clase IgG natural es ácido glutámico o glutamina; o el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina o leucina. En otras formas de realización preferidas, el anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica al anticuerpo de clase IgG natural tiene un residuo de ácido glutámico en la posición 250 y el residuo de fenilalanina en la posición 428; o el residuo de aminoácido 250 es glutamina y el residuo de aminoácido 428 es fenilalanina; o el residuo de aminoácido 250 es glutamina y residuo de aminoácido 428 es leucina.

En algunos aspectos de la divulgación, el anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica a una región constante de anticuerpo de clase IgG natural incluye un residuo de aminoácido en la posición 314 diferente del presente en el anticuerpo natural, de modo que se reduce la afinidad de unión a FcRn y/o se reduce la semivida en suero respecto al anticuerpo natural. Las formas de realización incluyen anticuerpos en los que el residuo de aminoácido 314 es alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. En una forma de realización preferida, el residuo de aminoácido 314 es arginina.

En otros aspectos de la divulgación, el anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica a una región constante de anticuerpo de clase IgG natural incluye un residuo de aminoácido en la posición 250 seleccionado del grupo que consiste en arginina, asparagina, ácido aspártico, lisina, fenilalanina, prolina, triptófano o tirosina, de modo que se reduce la afinidad de unión a FcRn y/o se reduce la semivida en suero respecto al anticuerpo natural. De forma similar, el residuo de aminoácido en la posición 428 puede estar sustituido con un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina o valina, de modo que se reduce la afinidad de unión a FcRn y/o se reduce la semivida en suero respecto al anticuerpo natural.

La presente divulgación proporciona además un procedimiento de modificar un anticuerpo de clase IgG en el que dicho procedimiento comprende sustituir al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 con un aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado, de modo que causa alteración de la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo no modificado.

La presente invención proporciona además moléculas polinucleotídicas que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de la reivindicación 1.

Preferentemente, el vector de expresión es un vector de expresión replicable.

Opcionalmente, dicho procedimiento comprende además: preparar un segundo vector de expresión (preferentemente un vector de expresión replicable), que comprende un promotor ligado operablemente a ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina complementaria y transformar además dicha línea celular con dicho segundo vector.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y procedimientos de profilaxis y terapia usando inmunoglobulinas modificadas (incluidas las inmunoglobulinas conjugadas con toxinas y radionúclidos), proteínas y otras moléculas bioactivas de la invención que tienen semividas alteradas. También se incluyen procedimientos de diagnóstico usando inmunoglobulinas, proteínas y otras moléculas bioactivas de la invención modificadas que tienen alteradas las semividas. En formas de realización preferidas, las modificaciones de aminoácidos de la presente invención se pueden usar para extender la semivida en suero de un anticuerpo terapéutico o diagnóstico. Por ejemplo, la presente invención proporciona un anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de clase IgG con una semivida de eliminación *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3 veces más prolongada que la del correspondiente anticuerpo sin modificar. El anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de la divulgación, en el que al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 250, 314 o 428 es diferente del presente en el anticuerpo no modificado. En formas de realización preferidas, el anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado tiene una semivida de eliminación *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3, 1,5, 1,8, 1,9 o superior a 2,0 veces más prolongada que la del correspondiente anticuerpo no modificado.

La presente divulgación también proporciona un anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de clase IgG con un aclaramiento *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3 veces menor que el del correspondiente anticuerpo sin modificar. El anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de la divulgación, en el que al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 250, 314 y 428 es diferente del presente en el anticuerpo no modificado. En formas de realización preferidas, el anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado tiene un aclaramiento *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3, 1,5, 1,8, 2,0, 2,3, 2,5, 2,8 veces o superior a 3,0

veces menor que el del correspondiente anticuerpo no modificado. Preferentemente, el anticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en daclizumab, fontolizumab, visilizumab y M200.

La presente divulgación proporciona además un anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de clase IgG con un área bajo la curva concentración-tiempo *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3 veces mayor que la del correspondiente anticuerpo sin modificar. El anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado de la divulgación, en el que al menos un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en los residuos 250, 314 y 428 es diferente del presente en el anticuerpo no modificado. En formas de realización preferidas, el anticuerpo terapéutico o diagnóstico modificado tiene una semivida de eliminación *in vivo* de al menos aproximadamente 1,3, 1,5, 1,8, 2,0, 2,3, 2,6, 2,8 veces o superior a 3,0 veces mayor que la del correspondiente anticuerpo no modificado.

En formas de realización alternativas, las modificaciones de aminoácidos de la presente invención también se pueden usar para reducir la semivida en suero de un anticuerpo terapéutico o diagnóstico. Dichos anticuerpos terapéuticos o diagnósticos son bien conocidos en la técnica y se enumeran en la siguiente descripción de la invención.

La invención también proporciona un anticuerpo terapéutico modificado que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEC ID N° 118 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de las SEC ID N° 122, 123, 127 y 128. La invención también proporciona un vector que comprende un polinucleótido que codifica una o más de estas secuencias de aminoácido de las cadenas ligera o pesada. La presente invención proporciona además una célula huésped que comprende este vector.

Además, la divulgación proporciona: un anticuerpo terapéutico modificado que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEC ID N° 129 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de las SEC ID N° 130-134; un anticuerpo terapéutico modificado que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEC ID N° 135 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de las SEC ID N° 136-140; y un anticuerpo terapéutico modificado que comprende una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEC ID N° 141 y una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada seleccionada de las SEC ID N° 142-146. La divulgación también proporciona vectores, que comprenden una o más de las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos terapéuticos modificados indicados anteriormente; y la invención proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores indicados anteriormente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Ilustración de la estructura de una molécula IgG

Figura 2. Vía de rescate de moléculas de IgG.

Figura 3A. Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG2M3 y OST577-IgG1 con las posiciones 250, 314 y 428 de la cadena pesada resaltadas "OST577-VH" (SEC ID N° 1) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1. "IgG2M3-CH" (SEC ID N° 2) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de OST577-IgG2M3. "IgG1-CH" (SEC ID N° 3) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de OST577-IgG1. "OST577-VL" (SEC ID N° 4) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1. "LAMBDA2-CL" (SEC ID N° 5) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1.

Figura 3B. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes del OST577-IgG2M3 modificado en comparación con OST577-IgG2M3 no modificado (véase la Tabla 1 para la SEC ID N° de cada secuencia de aminoácidos divulgada).

Figura 3C. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de OST577-IgG1 modificado en comparación con OST577-IgG1 sin modificar.

Figura 3D. Secuencias de aminoácidos de Hu1 D10-IgG2M3 and Hu1 D10-IgG1 con las posiciones 250, 314 y 428 de la cadena pesada resaltadas "Hu1 D10-VH" (SEC ID N° 6) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de Hu1 D10-IgG2M3 o Hu1 D10-IgG1. "IgG2M3-CH" (SEC ID N° 2) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de Hu1 D10-IgG2M3. "IgG1-CH" (SEC ID N° 7) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de Hu1 D10-IgG1. "Hu1 D10-VL" (SEC ID N° 8) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de Hu1 D10-IgG2M3 o Hu1 D10-IgG1. "KAPPA-CL" (SEC ID N° 9) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de Hu1 D10-IgG2M3 o Hu1 D10-IgG1.

Figura 3E. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de Hu1 D10-IgG2M3 modificado en comparación con Hu1 D10-IgG2M3 sin modificar.

Figura 3F. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de Hu1 D10-IgG1 modificado en comparación con Hu1 D10-IgG1 sin modificar.

5 Figura 3F. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de Hu1D 10-IgG1 modificado en comparación con Hu1D10-IgG1 sin modificar.

Figura 3G. Secuencias de aminoácidos de Hu1D10-IgG3 y Hu1D10-IgG4 con las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada resaltadas. "Hu1D10-VH" (SEC ID N° 6) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de Hu1D10-IgG3 o Hu1D10-IgG4. "IgG3-CH" (SEC ID N° 113) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de Hu1D10-IgG3. "IgG4-CH" (SEC ID N° 114) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de Hu1D10-IgG4. "Hu1D10-VL" (SEC ID N° 8) representa la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de Hu1D10-IgG3 o Hu1D10-IgG4. "KAPPA-CL" (SEC ID N° 9) representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de Hu1D10-IgG3 o Hu1D10-IgG4.

15 Figura 3H. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes del mutante M428L Hu1D10-IgG3 (SEC ID N° 115) en comparación con Hu1D10-IgG3 sin modificar.

Figura 3I. Secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de los mutantes M428L Hu1D10-IgG4 (SEC ID N° 116) y T250Q/M428L Hu1D10-IgG4 (SEC ID N° 117) en comparación con Hu1D10-IgG4 sin modificar.

Figura 4. Ilustración del procedimiento de PCR con extensión por solapamiento

20 Figura 5A. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pVAg2M3-OST577

Figura 5B. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pVAg1.N-OST577

Figura 6. Mapa de restricción del vector de la cadena ligera pVA2-OST577

Figura 7A. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pVAg2M3-Hu1 D10

Figura 7B. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pVAg1.N-Hu1 010

25 Figura 7C. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pHuHCg3.Tt.D-Hu1D10

Figura 7D. Mapa de restricción del vector de la cadena pesada pHuHCg4.Tt.D-Hu1D10

Figura 8. Mapa de restricción del vector de la cadena ligera pVk-Hu1D10.

Figura 9A. Mapa de restricción del vector de FcRN humano pDL208

Figura 9B. Mapa de restricción del vector de FcRN de Rhesus pDL410

30 Figura 10A. Análisis SDS-PAGE de anticuerpos de tipo salvaje y mutantes OST577-IgG2M3 Los anticuerpos de tipo salvaje y mutantes OST577-IgG2M3 purificados se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, como se describe en el Ejemplo 5.

Figura 10B. Análisis SDS-PAGE de anticuerpos de tipo salvaje y mutantes OST577-IgG1. Los anticuerpos de tipo salvaje y mutantes OST577-IgG1 purificados se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, como se describe en el Ejemplo 5.

Figura 11A. Ensayo de unión competitiva de un solo punto de los diversos mutantes de la posición 250 de OST577-IgG2M3 a FcRn humano. La unión del anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NSO transfeccionadas en presencia de anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje o mutantes en la posición 250 en FBB, a Ph 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 11B. Ensayo de unión competitiva de un solo punto de los diversos mutantes de la posición 314 de OST577-IgG2M3 a FcRn humano La unión del anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NSO transfeccionadas en presencia de anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje o mutantes en la posición 314 en FBB, a Ph 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 11C. Ensayo de unión competitiva de un solo punto de los diversos mutantes de la posición 428 de OST577-IgG2M3 a FcRn humano. La unión del anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en presencia de anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje o mutantes en la posición 428 en FBB, a pH 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 12A. Ensayo de unión competitiva de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes a FcRn humano. La unión del anticuerpo HuEP5C7-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje en FBB, a pH 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 12B. Ensayo de unión competitiva de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes a FcRn humano. La unión del anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje en FBB, a pH 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 13. Unión del anticuerpo a células transfeccionadas con FcRn humano frente a células no transfeccionadas. La unión de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas o a células NS0 no transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 14. Ensayo de unión competitiva de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes a FcRn humano a 37°C. La unión del anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en presencia de concentraciones crecientes de los anticuerpos OST577-IgG2M3 competidores de tipo salvaje en FBB, a pH 6,0, se detectó con RPE conjugado con estreptavidina y se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C.

Figura 15A. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes al FcRn humano. La unión y liberación de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 15B. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y mutantes al FcRn humano. La unión y liberación de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 15C. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y mutantes al FcRn humano. La unión y liberación de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 15D. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes al FcRn de rhesus. La unión y liberación de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje o mutantes al FcRn de rhesus en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 15E. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y mutantes al FcRn de rhesus. La unión y liberación de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje o mutantes al FcRn de rhesus en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 7.

Figura 16A. Ensayo de unión competitiva de anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes a HBsAg. La unión de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje o mutantes a HBsAg se analizó en una competición ELISA, tal como se ha descrito el Ejemplo 8.

Figura 16B. Ensayo de unión competitiva de anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y mutantes a HBsAg. La unión de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje o mutantes a HBsAg se analizó en una competición ELISA, tal como se ha descrito el Ejemplo 8.

Figura 17A. Ensayo de unión de anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes al alelo de la cadena β de

HLA-DR. La unión de los anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje o mutantes a células Raji se analizó en un ensayo de unión FACS, tal como se ha descrito el Ejemplo 8.

Figura 17B. Ensayo de unión de anticuerpos Hu1D10-IgG1 de tipo salvaje y mutantes al alelo de la cadena β de HLA-DR. La unión de los anticuerpos Hu1D10-IgG1 de tipo salvaje o mutantes a células Raji se analizó en un ensayo de unión FACS, tal como se ha descrito el Ejemplo 8.

Figura 18A. Ensayo ADCC de anticuerpos Hu1D10-IgG1 y Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes usando PBMC de un donante 158V/V. La actividad ADCC de los anticuerpos Hu1D10-IgG1 y Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes en células Raji se determinó usando PBMC aislados de un donante portador de alelos de Fc γ RIII 158V/V, como se describe en el Ejemplo 8

Figura 18B. Ensayo ADCC de anticuerpos Hu1D10-IgG1 y Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes usando PBMC de un donante 158F/F. La actividad ADCC de los anticuerpos Hu1D10-IgG1 y Hu1D10-IgG2M3 de tipo salvaje y mutantes en células Raji se determinó usando PBMC aislados de un donante portador de alelos de Fc γ RIII 158F/F, como se describe en el Ejemplo 8

Figura 19. Farmacocinética de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y variantes en macaco rhesus. Las concentraciones medias en suero observadas y modeladas (μ g/ml) y las desviaciones estándar de los anticuerpos OST577-IgG2M3 de tipo salvaje y variantes administrados mediante infusión a una dosis de 1 mg/kg a grupos de cuatro macacos rhesus se representaron en forma de una función del tiempo (días después de la infusión), como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Figura 20. Farmacocinética de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y variantes en macaco rhesus. Las concentraciones medias en suero observadas y modeladas (μ g/ml) y las desviaciones estándar de los anticuerpos OST577-IgG1 de tipo salvaje y variantes administrados mediante infusión a una dosis de 1 mg/kg a grupos de cuatro macacos rhesus se representaron en forma de una función del tiempo (días después de la infusión), como se ha descrito en el Ejemplo 10.

Figura 21A. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos of Hu1D10-IgG3 de tipo salvaje y mutantes al FcRn. La unión y liberación de los anticuerpos Hu1D10-IgG3 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 21B. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos of Hu1D10-IgG4 de tipo salvaje y mutantes al FcRn. La unión y liberación de los anticuerpos Hu1D10-IgG4 de tipo salvaje o mutantes al FcRn humano en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 21C. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos Hu1D10-IgG3 de tipo salvaje y mutantes al FcRn de rhesus. La unión y liberación de los anticuerpos Hu1D10-IgG3 de tipo salvaje o mutantes al FcRn de rhesus en células NS0 transfeccionadas en FEB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 21D. Unión dependiente de pH y liberación de anticuerpos Hu1D10-IgG4 de tipo salvaje y mutantes al FcRn de rhesus. La unión y liberación de los anticuerpos Hu1D10-IgG4 de tipo salvaje o mutantes al FcRn de rhesus en células NS0 transfeccionadas en FBB, a pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5 o 8, 0, se analizó mediante citometría de flujo, tal como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 22. Secuencias de aminoácidos de Daclizumab con varias mutaciones de unión a FcRn.

Figura 23. Secuencias de aminoácidos de Fontolizumab con varias mutaciones de unión a FcRn.

Figura 24. Secuencias de aminoácidos de Visilizumab con varias mutaciones de unión a FcRn.

Figura 25. Secuencias de aminoácidos de M200 con varias mutaciones de unión a FcRn.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

I. Anticuerpos modificados con alteración de la afinidad de unión a FcRn y/o de las semividas en suero

Con el fin de que la invención se entienda más completamente, se exponen varias definiciones.

Como se usa en el presente documento, los términos “inmunoglobulina” y “anticuerpo” se refieren a proteínas

- compuestas por uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), delta, epsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de las inmunoglobulinas. Las “cadenas ligeras” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable kappa o lambda en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulinas de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) están codificadas, de forma similar, por el gen de la región variable de la cadena pesada (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionadas en lo que antecede, por ejemplo gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).
- Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, en la que cada par tiene una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de las cadenas ligera y pesada son, juntas, responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras de anticuerpo. Además de los anticuerpos tetraméricos, las inmunoglobulinas pueden existir en diversas otras formas, incluidos, por ejemplo Fv, Fab y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (p. ej., Lanzavecchia y Scheidegger, Eur. J. Immunol. 17: 105-111 (1987)) y en cadenas sencillas (p. ej., Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988), y Bird y col., Science, 242:423-426 (1988). (véase, en general, Hood y col., "Immunology", 2nd ed., Benjamin, New York (1984), and Hunkapiller and Hood, Nature, 323:15-16 (1986)).
- La expresión “anticuerpos genéticamente alterados” se refiere a anticuerpos en los que la secuencia de residuos de aminoácidos ha cambiado con respecto a la de un anticuerpo nativo o salvaje. Dada la relevancia de las técnicas de ADN recombinante, la presente invención no está limitada a la modificación de secuencias de aminoácidos que se encuentran en los anticuerpos de aparición natural. Como se describe más adelante, los anticuerpos sometidos a ingeniería previamente se pueden rediseñar de acuerdo con la presente invención con el fin de obtener las características deseadas de alteración de la afinidad de unión a FcRn y/o de la semivida en suero. Las posibles variantes de los anticuerpos modificados útiles en la presente invención son muchas y varían desde el cambio de solo uno o unos pocos aminoácidos al rediseño completo de, por ejemplo, la región variable o constante. Los cambios en la región constante se realizarán, en general, con el fin de mejorar o alterar las características, tales como fijación del complemento, interacción con varios receptores Fc-gamma y otras funciones efectoras. Los cambios en la región variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión al antígeno.
- Un anticuerpo que tiene una región constante sustancialmente idéntica a la región constante del anticuerpo de clase IgG natural se refiere a un anticuerpo en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica, es decir al menos aproximadamente un 85-90% y, preferentemente, al menos un 95% idéntica, a la secuencia de aminoácidos de la región constante del anticuerpo de clase IgG natural.
- En muchos usos preferidos de la presente invención, incluido el uso in vivo de los anticuerpos modificados en seres humanos y en ensayos de detección in vitro, puede ser preferible usar anticuerpos humanos o humanizados quiméricos, privatizados que se han modificado (es decir, mutado) de acuerdo con la presente invención.
- La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo en el que la región constante procede de un anticuerpo de una especie (normalmente humano) y la región variable procede de un anticuerpo de otra especie (normalmente de un roedor). Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229: 1202-1207 (1985); Oi y col., BioTechniques 4:214-221 (1986); Gillies y col., J. Immunol. Methods 125:191-202 (1989); las patentes de EE.UU. N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397.
- La expresión “anticuerpo primatizado” se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de mono y regiones constantes de humano. En la técnica se conocen procedimientos para producir anticuerpos primatizados Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.658.570; 5.681.722; y 5.693.780.
- La expresión “anticuerpo humanizado” o “inmunoglobulina humanizada” se refiere a una inmunoglobulina que comprende una estructura humana, al menos una, y preferentemente todas, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano y en el que cualquier región constante presente sea sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir al menos aproximadamente un 85-90% y, preferentemente, al menos un 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CRD, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina nativa. A menudo, los residuos de la estructura en las regiones de estructura humanas estarán sustituidos con el correspondiente residuo del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones en la estructura se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la técnica mediante, por ejemplo, modelización de las interacciones de los residuos de la CDR y la estructura para identificar los residuos de la estructura importantes para la unión al

antígeno y comparación de secuencias para identificar residuos de la estructura inusuales den posiciones concretas. Véanse, por ejemplo, Queen y col., las patentes de EE.UU. Nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; 6.180.370. Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, incluidos, por ejemplo, injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación de PCT WO 91/09967; patentes de EE.UU. nº 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089), *veneering o resurfacing* (cubrir la superficie) (documento EP 592,106; documento EP 519,596; Padlan, Mol. Immunol., 28:489-498 (1991); Studnicka y col., Prot. Eng. 7:805-814 (1994); Roguska y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 :969-973 (1994), y transposición de cadenas (patente de EE.UU. nº 5.565.332).

Pueden ser deseables los anticuerpos completamente humanos para tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluidos procedimientos de expresión en fagos descritos en lo que antecede usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse las patentes de EE.UU. números 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645; WO 98/50433; WO 98/24893; WO 98/16654; WO 96/34096; WO 96/33735; y WO 91/10741.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Para una revisión de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, Int Rev. Immunol. 13:65-93 (1995). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea nº 0 598 877; las patentes de EE.UU. Nº 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598.

Además, empresas tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Medarex (Princeton, NJ) se pueden comprometer para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita en lo que antecede.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se usa un anticuerpos monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo (Jespers y col., Biotechnology 12: 899-903 (1988).

Como se usa en el presente documento, el término "alterar" puede hacer referencia a "aumentar" o a "reducir".

La presente divulgación proporciona un anticuerpo modificado de clase IgG, en el que al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 está sustituido por un residuo de aminoácido diferente del presente en el anticuerpo no modificado.

Los anticuerpos de clase IgG incluyen anticuerpos de of IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. La región constante de la cadena pasada de una molécula de IgG está indicada en la Figura 1. La numeración de los residuos en la cadena pesada es la del índice de UE (Kabat y col., op. cit.). La sustitución se puede realizar en la posición 250, 314 o 428 solo, o en cualquier combinaciones de los mismos, tales como en las posiciones 250 y 428, o en las posiciones 250 y 314 o en las posiciones 314 y 428, o en las posiciones 250, 314 y 428, con las posiciones 250 y 428 como combinación preferida.

Para cada posición, el aminoácido sustituto puede ser cualquier residuo de aminoácido diferente del presente en dicha posición del anticuerpo no modificado.

Para la posición 250, el residuo de aminoácido sustituto puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a treonina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, valina, triptófano o tirosina.

Para la posición 314, el residuo de aminoácido sustituto puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a leucina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina valina, triptófano o tirosina.

Para la posición 428, los residuos de aminoácido sustitutos puede ser cualquier residuo de aminoácido distinto a metionina, incluidos, entre otros, alanina, cisteína, ácido aspártico, ácido glutámico, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, lisina, leucina, asparagina, prolina, glutamina, arginina, serina, treonina valina, triptófano o tirosina. La presente divulgación proporciona anticuerpos de clase IgG que comprenden al menos una de las sustituciones de aminoácidos descritas en lo que antecede. Por ejemplo, la presente invención proporciona regiones constantes

mutadas de IgG2M3, que comprenden dos de las sustituciones mencionadas en lo que antecede en la posición 250, 314 y/o 428. Las secuencias de aminoácidos se algunas sustituciones específicas (es decir, mutaciones) de la región constante proporcionadas por la presente invención se divulgan en la Tabla 1 (SEC ID N° 10-66) y la Figura 3B.

5

Tabla 1

Aminoácido sustituto	250	314	428
Alanina (A)	T250A; SEC ID N° 10	L314A; SEC ID N° 29	M428A; SEC ID N° 48
Cisteína (C)	T250C; SEC ID N° 11	L314C; SEC ID N° 30	M428C; SEC ID N° 49
Ácido aspártico (D)	T250D; SEC ID N° 12	L314D; SEC ID N° 31	M428D; SEC ID N° 50
Ácido glutámico (E)	T250E; SEC ID N° 13	L314E; SEC ID N° 32	M428E; SEC ID N° 51
Fenilalanina (F)	T250F; SEC ID N° 14	L314F; SEC ID N° 33	M428F; SEC ID N° 52
Glicina (G)	T250G; SEC ID N° 15	L314G; SEC ID N° 34	M428G; SEC ID N° 53
Histidina (H)	T250H; SEC ID N° 16	L314H; SEC ID N° 35	M428H; SEC ID N° 54
Isoleucina (I)	T250I; SEC ID N° 17	L314I; SEC ID N° 36	M428I; SEC ID N° 55
Lisina (K)	T250K; SEC ID N° 18	L314K; SEC ID N° 37	M428K; SEC ID N° 56
Leucina (L)	T250L; SEC ID N° 19	Salvaje	M428L; SEC ID N° 57
Metionina (M)	T250M; SEC ID N° 20	L314M; SEC ID N° 38	Salvaje
Asparagina (N)	T250N; SEC ID N° 21	L314N; SEC ID N° 39	M428N; SEC ID N° 58
Prolina (P)	T250P; SEC ID N° 22	L314P; SEC ID N° 40	M428P; SEC ID N° 59
Glutamina (Q)	T250Q; SEC ID N° 23	L314Q; SEC ID N° 41	M428Q; SEC ID N° 60
Arginina (R)	T250R; SEC ID N° 24	L314R; SEC ID N° 42	M428R; SEC ID N° 61
Serina (S)	T250S; SEC ID N° 25	L314S; SEC ID N° 43	M428S; SEC ID N° 62
Treonina (T)	Salvaje	L314T; SEC ID N° 44	M428T; SEC ID N° 63
Valina (V)	T250V; SEC ID N° 26	L314V; SEC ID N° 45	M428V; SEC ID N° 64
Triptófano (W)	T250W; SEC ID N° 27	L314W; SEC ID N° 46	M428W; SEC ID N° 65
Tirosina (Y)	T250Y; SEC ID N° 28	L314Y; SEC ID N° 47	M428Y; SEC ID N° 66

En un caso preferido, la presente invención proporciona un anticuerpo modificado que tiene alterada la semivida sérica o la afinidad de unión a FcRn respecto al anticuerpo no modificado. La presente divulgación proporciona además un anticuerpo modificado de clase IgG, en el que al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada, seleccionado del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428, está sustituido con otro aminoácido que es diferente del presente en el anticuerpo no modificado, de modo que altera la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida sérica del anticuerpo modificado en comparación con la afinidad de unión y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo sin modificar.

10

Los anticuerpos no modificados de la presente invención incluyen anticuerpos de aparición natural de todas las especies. La expresión "anticuerpos de aparición natural" se refiere a todos los anticuerpos producidos por un animal huésped. Ejemplos no limitantes de anticuerpos de aparición natural de la presente invención incluyen anticuerpos derivados de seres humanos, pollo, cabra y roedores (p. ej., ratas, ratones, hámster y conejos), incluidos roedores transgénicos sometidos a ingeniería genética para producir anticuerpos humanos (véase, por

15

ejemplo, Lonberg y col., documento WO93/12227; la patente de EE.UU. Nº 5.545.806; y Kucherlapati, y col., el documento WO 91/10741; la patente de EE.UU. Nº 6.150.584).).

Los anticuerpos no modificados de la presente invención también incluyen anticuerpos recombinantes que tienen las mismas secuencias de aminoácidos como anticuerpo natural o anticuerpos alterados genéticamente que tienen secuencias de aminoácidos modificadas en comparación con los anticuerpos de aparición natural. Pueden fabricarse en cualquier sistema de expresión, incluidos los sistemas de expresión procariotas y eucariotas, o usando procedimientos de expresión en fagos (véase, p. ej., Dower y col., el documento WO 91/17271 y McCafferty y col., el documento WP92/01 047; la patente de EE.UU. Nº 5.969.108.

Los anticuerpos no modificados de la presente invención también incluyen anticuerpos quiméricos, primatizados, humanizados y humanos (véase la discusión anterior). En consecuencia, se puede producir un anticuerpo modificado de la presente invención sustituyendo un residuo de aminoácido en la posición 250, 314 o 428 en un anticuerpo humanizado, primatizado o quimérico, en el que en anticuerpo humanizado, primatizado o quimérico se ha derivado previamente a partir de un anticuerpo nativo.

Preferentemente, los anticuerpos quiméricos comprenden regiones variables derivadas de roedores y regiones constantes derivadas de seres humanos, de modo que los anticuerpos quiméricos tienen semividas más prolongadas y son menos inmunogénicos cuando se administran a un sujeto humano. Normalmente, los anticuerpos humanizados comprenden al menos una CDR de los anticuerpos donantes (por ejemplo, anticuerpos murinos o de pollo) y estructuras humanas de la cadena pesada y/o ligera. En ocasiones, algunos residuos de aminoácidos en las estructuras humanas estarán sustituidos por los residuos en las posiciones equivalentes de los anticuerpos donantes para asegurar la unión adecuada de los anticuerpos humanizados a sus antígenos. Las guías detalladas de la humanización de anticuerpos se divulgan en las patentes de EE.UU. Nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370.

Los anticuerpos no modificados de la presente invención pueden incluir anticuerpos alterados genéticamente que son funcionalmente equivalentes a los correspondientes anticuerpos de aparición natural. Se prefieren los anticuerpos no modificados que están alterados genéticamente para proporcionar mejor estabilidad y/o eficacia terapéutica. Ejemplos de anticuerpos alterados incluyen aquéllos con sustituciones conservadoras de residuos de aminoácidos y una o más delecciones o adiciones de aminoácidos que no alteran significativamente la utilidad de la unión a antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más residuos de aminoácidos para completar el rediseño de una región con la condición de que se mantenga la unión o utilidad funcional. Los anticuerpos de la presente invención pueden alterarse postraduccionalmente (p. ej., acetilación y fosforilación) o pueden alterarse sintéticamente (p. ej., la fijación de un grupo marcador).

Los anticuerpos no modificados de la presente invención pueden incluir anticuerpos que tienen afinidades de unión potenciadas por sus antígenos a través de alteraciones genéticas de las regiones variables (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.350.861).).

En una forma de realización alternativa, las IgG modificadas de la presente invención que tienen semividas más largas que las IgG de tipo salvaje (o no modificadas) también pueden incluir IgG cuyos sitios bioactivos, tales como los sitios de unión a antígeno, los sitios de unión a Fc-receptor o sitios de unión al complemento, se modifican mediante ingeniería genética para incrementar o reducir dichas actividades en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje,

Los anticuerpos modificados de la presente invención pueden ser de cualquiera de los isotipos reconocidos, pero se prefieren los cuatro isotipos de IgG, siendo especialmente preferidas las IgG1 y la IgG2. Se incluyen los anticuerpos con regiones constantes mutadas para que tengan funciones efectoras reducidas, por ejemplo el IgG2M3 y otros mutantes de IgG2 descritos en la patente de EE.UU. nº 5.834.597. En un aspecto preferido, los anticuerpos no modificados y modificadas en la presente invención comprenden regiones constantes de la cadena pesada de IgG humanas.

La presente invención se puede aplicar a cualquier anticuerpo que comprendan regiones constantes de la cadena pesada de la clase IgG, preferentemente IgG1, IgG2, IgG2M3, IgG3 y IgG4. Las regiones variables de la cadena pesada de dichos anticuerpos pueden derivar de cualquier anticuerpo seleccionado. Ejemplos de anticuerpos divulgados en el presente documento incluyen OST577-IgG1 y OST577-IgG2M3, que comprende las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti virus de la hepatitis B humano OST577 (Ehrlich y col., Hum. Antibodies Hybridomas 3:2-7 (1992)), la region constante de la cadena ligera del lambda-2 humano y la region constante de la cadena pesada de IgG1 y IgG2M3 humanas, respectivamente. En el presente documento también se divulgan Hu1D10-IgG1 y Hu1D10-IgG2M3, que comprenden las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo Hu1D10 anti alelo de la cadena β de HLA-DR humanizado (Kostelny y col., Int. J. Cancer

93:556-565 (2001)), la region constante de la cadena ligera de kappa humano y las regiones constante de la cadena pesada mencionados en lo que antecede de IgG1 e IgG2M3 humanas, respectivamente.

Otros ejemplos de la presente invención divulgados en el presente documento incluyen mutantes de los anticuerpos humanos IgG1, IgG2M3 (una variante genéticamente alterada de IgG2), IgG3 e IgG4 humanas, que ilustran la alteración de la semivida en suero de un anticuerpo de clase IgG. La región constante de la cadena pesada de IgG2M3 deriva de la de IgG2 sustituyendo los residuos 234 y 237 de la región constante de la cadena pesada de IgG2 con alanina. La generación de la región constante de la cadena pesada de IgG2M3 se divulga en la patente de EE.UU. N° 5.834.597.

Generalmente, los anticuerpos modificados de la presente invención incluyen cualquier molécula de inmunoglobulina que se une (preferentemente de forma inmuno-específica, es decir compete unión inespecífica, determinado mediante inmunoensayos bien conocidos en la técnica para analizar la unión específica anticuerpo-antígeno) a un antígeno y contiene un fragmento de unión a FcRn. Dichos anticuerpos incluyen, entre otros, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, multiespecíficos, humanos, humanizados, quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fv unidas por disulfuro y fragmentos que contienen un dominio V_L o V_H, o incluso una región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno, en ciertos casos, sometido a ingeniería para contener o condensarse a un dominio de unión a FcRn.

Las moléculas IgG modificadas de la invención pueden incluir las subclases de IgG de cualquier animal dado. Por ejemplo, en seres humanos, la clase IgG incluye IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4; y la clase IgG de ratón incluye IgG1, IgG2a, IgG2b, e IgG3; y la clase IgG de rata incluye IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, e IgG3. Se sabe que ciertas subclases de IgG, por ejemplo, IgG2b e IgG2c de rata, tienen mayores tasas de aclaramiento que, por ejemplo, la IgG1 (Medesan y col., Eur. J. Immunol., 28:2092-2100 (1998)). Por tanto, cuando se usan otras subclases de IgG1 distintas a IgG1, puede ser ventajoso sustituir uno o más de los residuos, particularmente en los dominios C_H2 y C_H3, que difieren de la secuencia de IgG1 con las de IgG1, de modo que se aumenta la semivida *in vivo* de los otros tipos de IgG.

Las inmunoglobulinas de la presente invención pueden ser de cualquier origen animal, incluidos aves y mamíferos. Preferentemente, los anticuerpos son humanos, de roedor, de burro, de oveja, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo. Como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de animales transgénicos para una o más inmunoglobulinas humanas, como se describe más adelante y, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 5.939.598 de Kucherlapati y col.

Además, los anticuerpos modificados de la presente invención pueden ser anticuerpos monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido o pueden ser específicos para epítopos heterólogos, tales como un polipéptidos heterólogos o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt y col., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las patentes de EE.UU. N° 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Los anticuerpos modificados de la invención incluyen derivados que, de otro modo, se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impide la unión del anticuerpo al antígeno y/o generar una respuesta anti-idiotípica. Por ejemplo, aunque no como limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado mediante, por ejemplo, glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación con grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando u otra proteína celular, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede realizar mediante técnicas conocidas, incluidas, entre otras, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos monoclonales útiles con le presente invención se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, incluido el uso de tecnologías de expresión en fagos, hibridoma y recombinante, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando técnicas de hibridoma, incluidas las conocidas y enseñadas en la técnica, por ejemplo en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988); Hammerling et al., in: "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas," Elsevier, New York (1981), pp. 563-681.

La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento, no está limitada a los anticuerpos

producidos mediante la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un clon sencillo, incluido un clon eucariota, procariota o de fago, y no el procedimiento por el cual se produce.

Los procedimientos para producir y seleccionar anticuerpos específicos usando la tecnología del hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. en un ejemplo no limitante, los ratones pueden ser inmunizados con un antígeno de interés o una célula que expresa dicho antígeno. Una vez que se detecta una respuesta, por ejemplo se detectan anticuerpos específicos por el antígeno en el suero de ratón, se extrae el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se condensan después mediante técnicas bien conocidas con células de mieloma adecuadas. Los hibridomas se seleccionan y clonan mediante dilución límite. Después, los clones de hibridoma se analizan mediante procedimientos conocidos en la técnica para células capaces de secretar anticuerpos capaces de unirse al antígeno. Se puede generar fluido ascítico, que generalmente contiene niveles elevados de anticuerpos, inoculando en los ratones por vía intraperitoneal clones de hibridoma positivos.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos también pueden ser útiles con la presente invención y se pueden generar mediante técnicas bien conocidas. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')₂, mediante escisión proteolítica de las moléculas de inmunoglobulina usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la cadena ligera completa, y la región variable, la región CH1 y la región bisagra de la cadena pesada.

Por ejemplo, también se pueden generar anticuerpos usando varios procedimientos de expresión conocidos en la técnica, incluida la expresión en fagos. En los procedimientos de expresión en fagos, los dominios de anticuerpo funcional se expresan sobre la superficie de las partículas del fago que portan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En una forma de realización concreta, dicho fago se puede utilizar para expresar dominios de unión a antígeno, tal como Fab y Fv o Fv estabilizado unido por disulfuro, expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (p. ej., humanos o murinos). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se pueden seleccionar o identificar con el antígeno, por ejemplo usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado por una superficie sólida o esfera. Los fagos usados en estos procedimientos normalmente son fagos filamentosos, incluidos los fagos fd y M13. Los dominios de unión a antígeno se expresan en forma de una proteína condensada de forma recombinante a la proteína del gen III o del gen VIII del fago. Como alternativa, la porción modificada de unión a FcRn de las inmunoglobulinas de la presente invención también se puede expresar en un sistema de expresión en fagos. Ejemplos de procedimientos de expresión en fagos que se pueden usar para fabricar inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas, de la presente invención incluyen los divulgados en Brinkman y col., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames y col., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettieborough y col., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic y col., Gene 187:9-18 (1997); Burton y col., Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); la publicación PCT WO 92/01047; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. números 5.698.426; 5.223.409; 5.403. 484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5. 780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Como se ha descrito en las referencias anteriores, tras la selección del fago se pueden aislar del fago las regiones que codifican el anticuerpo y usar para generar anticuerpos enteros, incluidos anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento deseado, y expresado en cualquier huésped deseado, incluidas células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, por ejemplo como se describe con detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando procedimientos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y col., BioTechniques 12:864-869 (1992); Sawai y col., Amer. J. Reprod. Immunol. 34:26-34 (1995); y Better y col., Science 240: 1041-1043 (1988). Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv y anticuerpos de cadena sencilla incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. Nº 4.946.778 y 5.258.498; Huston y col., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:7995-7999 (1993); y Skerra y col., Science 240:1038-1040 (1988).

En formas de realización concretas, los anticuerpos modificados tienen usos terapéuticos y/o profilácticos *in vivo*. Ejemplos de anticuerpos terapéuticos y profilácticos que se pueden modificar así incluyen, entre otros, SYNAGIS® (palivizumab Medimmune, MD) que es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-virus respiratorio sincitial (VRS) para el Tratamiento de pacientes con infección por el VRS; HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA), que es un anticuerpo monoclonal humanizado anti-HBR2 para el Tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RBMICADE® (infliximab) (Centocor, PA), que es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-TNF-α para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn; REPRO® (abciximab) (Centocor) que es un receptor anti-glicoproteína IIb/IIIa sobre las plaquetas para la prevención de la formación de coágulos; ZBNAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suiza), que es un anticuerpo monoclonal humanizado inmunosupresor anti-CD25 para la

prevención de rechazo de aloinjerto renal agudo. Otros ejemplos son F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Genentech); CDP860 que es un F(ab')₂ anti-CD18 humanizado (Celltech, UK); PR0542 que es un anticuerpo anti gp120 del VIH condensado con CD4 (Progenics/Genzyme Transgenics); OSTAVIRTM, que es un anticuerpo anti-virus de la hepatitis B humano (Protein Design Labs/Novartis); PROTOVIRTM, que es un anticuerpo IgG1 anti-CMV humanizado (Protein Design Labs/Novartis); IC14 que es un anticuerpo anti-CD14 (ICOS); AVASTINTM (bevacizumab), que es un anticuerpo IgG1 anti-VEGF humanizado (Genentech); ERBITUXTM (cetuximab) que es un anticuerpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone Systems); VITAXINTM, que es un anticuerpo anti- α V β 3 integrina humanizado (Applied Molecular Evolution/Medimmune); Campath-1H/LDP-03 (alemtuzumab), que es un anticuerpo IgG1 anti CD52 humanizado (Leukosite); ZAMYLTM, que es un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Labs/Kanebo); RITUXANTM (rituximab, que es un anticuerpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharmaceuticals/Genentech, Roche/Zenyaku); LYMPHOCIDETM, que es un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); REMITOGENTM, que es un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado (Protein Design Labs); ABX-IL8 que es un anticuerpo anti-IL8 humano (Abgenix); RAPTIVATM (efalizumab) que es un anticuerpo IgG1 humanizado (Genetech/Xoma); ICM3, que es un anticuerpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS); IDEC-114, que es un anticuerpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharmaceuticals/Mitsubishi); IDEC-131, que es un anticuerpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151, que es un anticuerpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152, que es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); NUIVONTM (visilizumab), que es una IgG anti-CD3 humanizada (Protein Design Labs); SG1.1, que es un anticuerpo anti-factor 5 (C5) del complemento humanizado (Alexion Pharmaceuticals); HUMIRATM (adalimumab), que es un anticuerpo anti-TNF- α humano (CAT/BASF); CDP870, que es un fragmento Fab anti-TNF- α humanizado (Celltech); IDEC-151, que es un anticuerpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharmaceuticals/Smith-Kline Beecham); MDX-CD4, que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/Genmab); CDP571, que es un anticuerpo IgG4 anti-TNF- α humanizado (Celltech); LDP-02, que es un anticuerpo anti- α 4 β 7 humanizado (LoukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A, que es un anticuerpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVATM, que es un anticuerpo IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTBGRENTM (natalizumab), que es un anticuerpo IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); MDX-33, que es un anticuerpo anti-CD64 humano (Fc γ R) (Medarex/Centexon); SCH55700, que es un anticuerpo IgG4 anti-IL-5 humanizado (Celltech/Schering); SB-240563 y SB-240683 que son anticuerpos anti-IL-5 y IL-4 humanizados, respectivamente (SmithKline Beecham); rhuMab-E25, que es un anticuerpo IgG1 anti-IgE humanizado (Genentech/Novartis/Tanox Biosystems); IDEC-152, que es un anticuerpo anti-CD23 primatizado (IDEC Pharmaceuticals); SIMULECTM (basiliximab), que es un anticuerpo IgG1 anti-CD25 quimérico (Novartis Pharmaceuticals); LDP-D1, que es un anticuerpo IgG anti- β 2-integrina humanizado (Leukosite); CAT-152, que es un anticuerpo anti-TGF- β 2 humano (Cambridge Antibody Technology); y Corsevin M, que es un anticuerpo anti-Factor VII quimérico (Centocor).

La presente divulgación permite la modificación de estos y otros anticuerpos terapéuticos para incrementar la semivida *in vivo*, permitiendo la administración de dosificaciones menos eficaces y/o dosificación menos frecuente del anticuerpo terapéutico. Dicha modificación para incrementar la semivida *in vivo* también puede ser útil para mejorar las inmunoglobulinas diagnósticas. Por ejemplo, el incremento de la semivida en suero de un anticuerpo diagnóstico puede permitir la administración de dosis menores para alcanzar suficiente sensibilidad diagnóstica. Como alternativa, la disminución de la semivida en suero puede ser ventajosa en aplicaciones en las que se desea un rápido aclaramiento de un anticuerpo diagnóstico.

En el presente documento se divulga la secuencia de aminoácidos de OST577-IgG2M3, incluida la secuencia de aminoácidos de su región variable de la cadena pesada (SEC ID N° 1) (OST577-VH) y la región constante (SEC ID N° 2) (IgG2M3-CH) con las posiciones 250, 314 y 428 resaltadas, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de su cadena ligera (SEC ID N° 4) (OST577-VL) y la región constante (SEC ID N° 5) (LAMBDA2-CL) (Figura 3A).

En el presente documento se divulga la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de OST577-IgG1 (SEC ID N° 3), con las posiciones 250, 314 y 428 resaltadas (Figura 3C).

El presente documento además proporciona un anticuerpo modificado que tiene una mayor afinidad de unión por FcRn y/o un incremento de la semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que los residuos aminoacídicos 250 y 428 de la región constante de la cadena pesada humana están sustituidos, a saber, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico o glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina o leucina.

En un ejemplo, dicho anticuerpo no modificado comprende la región constante de la cadena pesada de una molécula de IgG1, o IgG2, o IgG2M3, incluidos, entre otros, OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1. IgG1, IgG2 e IgG2M3 tienen un residuo de treonina en la posición 250 y un residuo de metionina en la posición 428. El residuo de

treonina en la posición 250 está sustituido con ácido glutámico (T250E) o glutamina (T250Q) y el residuo de metionina en la posición 428 está sustituido con fenilalanina (M428F) o leucina (M428L). La figura 3B divulga la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG2M3 modificado que tiene la sustitución de aminoácido de T250E (SEC ID N° 13), T250Q (SEC ID N° 23), M428F; SEC ID N° 52), o M428L (SEC ID N° 57). La figura 3C divulga la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 modificado que tiene la sustitución de aminoácido de T250D (SEC ID N° 67) T250E; SEC ID N° 68), T250Q (SEC ID N° 69), M428F; SEC ID N° 70), o M428L (SEC ID N° 71).

La presente invención proporciona un anticuerpo modificado daclizumab que tiene una mayor afinidad de unión por FcRn y/o una mayor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado. La modificación del aminoácido puede ser una cualquiera de las sustituciones siguientes:

1) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina.

2) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina.

3) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con leucina.

La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG2M3 modificado que tiene la doble sustitución de aminoácido de T250E/M428F (SEC ID N° 72), T250Q/M428F (SEC ID N° 73), o T250Q/M428L (SEC ID N° 74) se divulga en la Figura 3B.

La secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada de IgG1 modificado que tiene la doble sustitución de aminoácido de T250E/M428F (SEC ID N° 75), o T250Q/M428L (SEC ID N° 76) se divulga en la Figura 3C.

Los anticuerpos modificados con las sustituciones de aminoácidos dobles descritas en las posiciones 250 y 428 muestran extremadamente altas afinidades de unión por FcRn en comparación con las de los anticuerpos no modificados.

En una forma de realización preferida de la presente invención, la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero del anticuerpo modificado están incrementadas en al menos aproximadamente 30%, 50%, 80%, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, o 100 veces.

La presente divulgación proporciona un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y/o menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con otro aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado. Se ha demostrado que los anticuerpos modificados que tienen una sustitución de aminoácido en la posición 314 muestran una afinidad de unión reducida, lo que sugiere que la posición 314 debe modificarse si se desea una reducción de la semivida en suero de un anticuerpo. Preferentemente, el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. Más preferentemente, la sustitución de aminoácido es de leucina a alanina o arginina en la posición 314. Como se muestra en los Ejemplos, la afinidad de unión por FcRn del OST577-IgG2M3 modificado que comprende una sustitución de leucina a arginina se reduce en un 11% con respecto al OST577-IgG2M3 no modificado.

Como se muestra en la Figura 3B, L314A representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del IgG2M3 modificado, que tiene la sustitución de aminoácido de leucina a Alanina en la posición 314 (SEC ID N° 29). L314A representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del IgG2M3 modificado, que tiene la sustitución de aminoácido de leucina a arginina en la posición 314 (SEC ID N° 42).

La presente divulgación proporciona un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y/o menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que (1) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con arginina, asparagina, ácido aspártico, lisina,

fenilalanina, prolina, triptófano o tirosina, o (2) el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina o valina. Preferentemente, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido aspártico o el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glicina. Dicha sustitución de aminoácido puede reducir espectacularmente la semivida en suero de un anticuerpo. Como se muestra en los Ejemplos, la afinidad de unión por FcRn de OST577-IgG2M3 modificado que tiene dichas sustituciones de aminoácido se reduce en aproximadamente 5–7% con respecto a OST577-IgG2M3 no modificado.

Como se muestra en la Figura 3B, T250D representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del IgG2M3 modificado, que tiene la sustitución de aminoácido de treonina a ácido aspártico en la posición 250 (SEC ID N° 12). M428 representa la secuencia de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada del IgG2M3 modificado, que tiene la sustitución de aminoácido de metionina a glicina en la posición 428 (SEC ID N° 53).

En un aspecto concreto de la presente divulgación, la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo modificado se reduce en al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%.

La presente divulgación incluye las regiones constantes de la cadena pesada, las regiones Fc, o las regiones C_H2-C_H3 de los anticuerpos IgG modificados descritos en el presente documento, preferentemente, de los anticuerpos IgG1, IgG2 o IgG2M3 modificados que tienen las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

La presente divulgación también incluye un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N° 10-76. En una forma de realización preferida, estos polipéptidos son regiones constantes mutadas de IgG1, IgG2 o IgG2M3. Las regiones constantes de la cadena pesada de los anticuerpos modificados de la presente invención pueden unirse a la región variable de la cadena pesada de cualquier anticuerpo seleccionado para generar la cadena pesada híbrida deseada. Ejemplos de los anticuerpos seleccionados incluyen, entre otros, anticuerpos contra IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, HSV, CD3, CD33, CMV e IFN- γ . Además, las regiones variables pueden ser las de los anticuerpos de aparición natural de cualquier especie tal como un ser humano, un primate o un roedor. Como alternativa, pueden ser las de los anticuerpos alterados genéticamente, incluidos, entre otros, anticuerpos humanizados, anticuerpos que tienen mayores afinidades de unión a su antígeno a través de modificación genética o anticuerpos completamente humanos. Tal cadena pesada híbrida puede estar unida a una variedad de cadenas ligeras para producir el anticuerpo deseado. Las cadenas ligeras pueden ser cadenas ligeras lambda o kappa. Dado que la semivida en suero de un anticuerpo se determina principalmente en la región constante de la cadena pesada, se puede conseguir una semivida en suero deseada de un anticuerpo producido a través de las sustituciones de aminoácido en la región constante de la cadena pesada descrita en el presente documento.

II. Producción de anticuerpos modificados con alteración de la afinidad de unión a FcRn y/o de las semividas en suero

La presente invención proporciona procedimientos de producir anticuerpos con alteración de la afinidad de unión por FcRn y/o las semividas en suero. Preferentemente, la presente invención proporciona procedimientos para modificar un anticuerpo dado de clase IgG en una o más posiciones divulgadas en el presente documento. Esto se puede conseguir químicamente o mediante mutagénesis dirigida a sitio y producción recombinante usando cualquier procedimiento de producción conocido.

La presente divulgación proporciona un procedimiento de modificar un anticuerpo de clase IgG que comprende sustituir al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 con un aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado, de modo que causa alteración de la afinidad de unión por FcRn y/o la semivida en suero de dicho anticuerpo no modificado.

La sustitución se puede realizar en la posición 250, 314 o 428 solo o en cualquier combinación de los mismos, tal como en las posiciones 250 y 428.

Para incrementar la afinidad de unión por FcRn y/o incrementar la semivida en suero de un anticuerpo, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico o glutamina, y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina o leucina. Como alternativa, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con

fenilalanina; o el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con fenilalanina; o el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con leucina. Estos anticuerpos que tienen estas mutaciones dobles muestran afinidades de unión por FcRn excepcionalmente altas.

Para producir un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y/o menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, en el que el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con otro aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado. Preferentemente, el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina, arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina o valina. Más preferentemente, el residuo de aminoácido 314 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina o arginina.

Para producir un anticuerpo modificado que tiene una menor afinidad de unión por FcRn y menor semivida en suero en comparación con el anticuerpo no modificado, el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con arginina, asparagina, ácido aspártico, lisina, fenilalanina, prolina, triptófano o tirosina, o el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada está sustituido con alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, lisina, prolina, serina, treonina, tirosina o valina. Más preferentemente, el residuo de aminoácido 250 está sustituido con ácido aspártico o el aminoácido 428 está sustituido con glicina.

Las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento se consiguen mediante tecnología de ADN recombinante. En una forma de realización se puede usar mutagénesis dirigida a sitio para introducir las sustituciones de aminoácidos en el ADN que codifica un anticuerpo no modificado. Los ADN resultantes de anticuerpos modificados se liberan en las células huésped y los anticuerpos modificados se producen de esta manera. La alteración deseada de la afinidad de unión por FcRn de los anticuerpos modificados se puede seleccionar usando la tecnología de expresión en fagos o cualquier otro procedimiento adecuado conocido en la técnica y confirmado mediante la medición de la afinidad de unión.

Preferentemente, un procedimiento de producir anticuerpo modificado de clase IgG con alteración de la afinidad de unión por FcRn y alteración de la semivida en suero en comparación con un anticuerpo no modificado comprende:

- (a) preparar un vector de expresión replicable que comprende un promotor adecuado operablemente unido a un ADN que codifica al menos una región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina y en el que al menos un aminoácido de la región constante de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos 250, 314 y 428 está sustituido con un aminoácido que es diferente del presente en un anticuerpo no modificado, de modo que produce una alteración en la semivida en suero;
- (b) transformar las células huésped con dicho vector; y
- (c) cultivar dichas células huésped transformadas para producir dicho anticuerpo modificado.

Dicho procedimiento comprende de manera adicional y opcionalmente, tras la etapa (a) preparar un segundo vector de expresión replicable que comprende un promotor operablemente unido a un ADN que codifica una cadena ligera de la inmunoglobulina complementaria y en el que dicha línea celular está transformada adicionalmente con dicho vector.

Para generar el ADN en la etapa (a), las sustituciones de aminoácidos se pueden introducir mediante mutagénesis, incluidas, entre otras, mutagénesis dirigida a sitio (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492 (1985)), mutagénesis por PCR (Higuchi, en "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego (1990) pp. 177-183), y mutagénesis por casete (Wells y col., Gene 34:315-323 (1985)). Preferentemente, la mutagénesis dirigida a sitio se realiza mediante el procedimiento de PCR de solapamiento-extensión, que se divulga en los Ejemplos (Higuchi, en "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York (1989), pp. 61-70).

La técnica de PCR con solapamiento-extensión (Higuchi, *ibid.*) se puede usar para introducir cualquier mutación(ciones) deseadas en una secuencia diana (el AND de partida). Por ejemplo, como se muestra en la Figura 4, el primer ciclo de PCR en el procedimiento de solapamiento-extensión implica amplificar la secuencia diana con un cebador externo (Cebador 1) y un cebador interno para mutagénesis (cebador 3) y, por separado, con un segundo cebador externo (Cebador 4) y un cebador interno (cebador 2), lo que da dos segmentos de PCR

(segmentos A y B). El cebador interno de mutagénesis (cebador 3) está diseñado para contener faltas de correspondencia con la secuencia diana especificando la(s) mutación(ciones) deseada(s). En el segundo ciclo de PCR, los productos del primer ciclo de PCR (segmentos A y B) se amplifican mediante PCR usando los dos cebadores externos (cebadores 1 y 4). El segmento de PCR de longitud completa resultante (segmento C) se digiere con enzimas de restricción y el fragmento de restricción resultante se clona en un vector adecuado.

Como primera etapa de la mutagénesis, el ADN de partida se clona operablemente en un vector para mutagénesis. Los cebadores están diseñados para reflejar la sustitución de aminoácido deseada (véanse más detalles en los Ejemplos). En un ejemplo, los vectores usados para la mutagénesis *in vitro* se pueden usar para dirigir la expresión de proteínas. Por tanto, el ADN resultante de la PCR de solapamiento-extensión se puede volver a clonar en el vector para mutagénesis de modo que se crea un vector de expresión que comprende el ADN con la mutación deseada. Un ejemplo del vector para mutagénesis que comprende el ADN de partida incluye, entre otros, pVAg2M3-OST577.

Por ejemplo, las mutaciones en la posición 250 se realizaron mediante amplificación de la región que rodea al fragmento PinAI-BamHI de pVAg2M3-OST577 (véase el mapa de restricción de la Figura 5A) en un procedimiento de dos etapas usando el procedimiento de solapamiento-extensión descrito en lo que antecede, digiriendo después el segmento de PCR resultante con PinAI y BamHI y clonando el fragmento de restricción resultante en pVAg2M3-OST577. De forma similar, las mutaciones en la posición 314 o 428 se realizaron mediante amplificación de la región que rodea al fragmento PmlI-BamHI mediante PCR de solapamiento-extensión, digiriendo después el segmento de PCR resultante con PmlI- y BamHI y clonando los fragmentos de restricción resultantes en pVAg2M3-OST577.

El ADN de partida puede ser un ADN que codifica un anticuerpo entero no modificado, una cadena pesada entera de inmunoglobulina de un anticuerpo no modificado, la región constante de una cadena pesada o parte de la región constante de la cadena pesada de un anticuerpo no modificado, siempre que incluya el residuo de aminoácido que se va a modificar.

Si el ADN que codifica el anticuerpo no modificado completo se usa como ADN de partida para la mutagénesis, todo el anticuerpo modificado se puede producir realizando las etapas (a), (b) y (c) del procedimiento descrito en el presente documento. La etapa entre la etapa (a) y la etapa (b) de dicho procedimiento para generar la cadena ligera complementaria no sería necesaria.

Si el ADN de partida para la mutagénesis es un ADN que codifica la cadena pesada entera de un anticuerpo no modificado, la mutagénesis dará lugar a un vector que comprende el ADN que codifica la cadena pesada modificada entera. Con el fin de producir un anticuerpo modificado entero, se realiza la etapa entre las etapas (a) y (b) del procedimiento divulgado en el presente documento. Es decir, otro vector de expresión replicable que comprende un promotor unido operablemente a un ADN que codifica la cadena ligera de la inmunoglobulina complementaria se co-transfecta en las mismas células huésped. Como resultado, tanto la cadena ligera complementaria como la cadena pesada modificada se expresan en las mismas células huésped y se ensamblan adecuadamente para dar lugar al anticuerpo modificado entero. Un ejemplo de dicho vector de expresión que comprende un ADN que codifica una cadena ligera de la inmunoglobulina incluye, entre otros, pVAA2-OST577.

Si el ADN de partida para mutagénesis es un ADN que codifica parte de la región constante de la cadena pesada, tal como el segmento C_H2-C_H3 o un dominio Fc, el ADN resultante que codifica tal cadena pesada parcial modificada se conecta primero en el marco con el resto de la cadena pesada no modificada, de modo que se genera el ADN que codifica una cadena pesada entera con la modificación descrita en el presente documento en la Etapa (a). Se produce un anticuerpo modificado entero mediante co-transfección de las células huésped con el vector que comprende el ADN que codifica la cadena ligera complementaria y el vector que comprende el ADN que codifica dicha cadena pesada modificada. La conexión del ADN que codifica la cadena pesada parcial modificada y la cadena pesada no modificada restante se puede conseguir usando las técnicas de clonación molecular estándar conocidas en la técnica de la biología molecular, tal como digestiones y uniones de restricción (Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)).

Las cadenas ligera y pesada se pueden clonar en los mismos o diferentes vectores de expresión. Los segmentos de ADN que codifican cadenas de inmunoglobulinas están operablemente unidos a secuencias control en el(los) vector(es) de expresión que garantizan la expresión de los polipéptidos de inmunoglobulina. Dichas secuencias control incluyen una secuencia señal, un promotor, un potenciador y una secuencia de terminación de la transcripción (véase, Queen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); el documento W0090/07861; Co y col., J. Immunol. 148:1149-1154 (1992); "Antibody Engineering: A Practical Guide", Borrebaeck, Ed., Freeman, New York (1997)).

Las células huésped se transforman usando las técnicas conocidas en la materia, tales como liposomas, fosfato cálcico, electroporación etc. (Sambrook y Russell, op. cit.). Preferentemente, las células huésped se transfeccionan de forma transitoria usando el procedimiento del liposoma.

5 Las células huésped usadas para producir el anticuerpo modificado de la presente invención se pueden cultivar en diversos medios conocidos en las técnicas.

10 Los anticuerpos modificados descritos en el presente documento se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico o secretados directamente en el medio. Preferentemente, los anticuerpos modificados en la presente invención se secretan al medio de cultivo. Los medios del cultivo de células huésped que producen anticuerpos modificados se recogen y los residuos celulares se precipitan mediante centrifugación. Se recogen los sobrenadantes y se someten a los ensayos de expresión de proteínas (véanse más detalles en los Ejemplos).

La expresión de un anticuerpo modificado se confirma mediante electroforesis en Gel usando análisis proteico en SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras o cualquier otra técnica conocida en la materia. También se pueden usar ELIS para detectar la expresión de un anticuerpo modificado y la cantidad de dicho anticuerpo.

15 Los anticuerpos modificados deberán retener la unión adecuada a antígenos en comparación con los anticuerpos no modificados. De acuerdo con esto, la unión adecuada anticuerpo-antígeno se analiza mediante los procedimientos conocidos en la técnica de la inmunología, tal como ELISA. Se pueden realizar experimentos adicionales para confirmar que los anticuerpos modificados tienen propiedades estructurales similares a las de los anticuerpos no modificados. Estos experimentos incluyen, ente otros, SDS-PAGE, SEC, ELISA y ensayos de unión a proteína A. Se prefiere el ensayo de unión a proteína A, ya que la proteína A se une a la misma región de la unión $C_{H2}-C_{H3}$ que el FcRn, aunque la unión implica diferentes residuos.

20

25 Los anticuerpos modificados preparados a partir de las células huésped se pueden purificar usando las técnicas conocidas en la materia, incluidas, entre otras, filtración en gel y cromatografía en columna (p. ej., cromatografía de afinidad mediante proteína A, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel). La pureza mínima aceptable del anticuerpo para usar en formulación farmacéutica será 90%, siendo preferida el 95%, más preferida el 98% y la más preferida del 99% o superior.

30 Las afinidades de unión de los anticuerpos producidos para FcRn se pueden detectar realizando un ensayo de unión competitivo a pH 6,0, la condición óptima para la unión al FcRn. Las afinidades de unión se pueden analizar inmovilizando FcRn sobre un sustrato sólido tal como perlas de Sepharose®. Como alternativa, las afinidades de unión se pueden evaluar usando un ELISA. Preferentemente, la presente invención investiga las afinidades de unión realizando un ensayo de unión competitivo en un sistema basado en células. Una serie de diluciones de un anticuerpo modificado producido y del anticuerpo no modificado se comparan según la unión al FcRn expresado en una línea celular, preferentemente una línea celular NS0. Los procedimientos experimentales para llevar a cabo un ensayo de unión competitiva se describen con detalle en los Ejemplos.

35 Los experimentos en la presente invención muestran que se pueden conseguir resultados de afinidad de unión similares con anticuerpos purificados o sobrenadantes de cultivos de las células productoras de anticuerpos. De acuerdo con esto, los sobrenadantes se pueden usar directamente para analizar las afinidades de unión por FcRn de los anticuerpos producidos con el fin de confirmar que se ha conseguido la alteración deseada de las afinidades de unión. Después de tal confirmación, el anticuerpo producir se somete a procedimientos de purificación más complejos.

40 También deberán realizarse ensayos de unión directa para confirmar que los anticuerpos modificados se unen al FcRn de un modo dependiente de pH. En particular, la afinidad de unión de los anticuerpos modificados por FcRn se analiza a un pH 6,0 y a un pH 8,0 (véanse más detalles en los Ejemplos). En general, la afinidad de unión a pH 6,0 deberá ser superior a la obtenida al pH 8,0.

45 La estabilidad biológica (o semivida en suero) se puede medir mediante diversos medios *in vitro* o *in vivo*, mediante, por ejemplo, el uso de una proteína radiomarcada y midiendo los niveles de radiactividad en suero como una función del tiempo, o mediante análisis de los niveles de anticuerpo intacto (de especificidad conocida) presente en el suero usando ELISA como una función del tiempo, en la que una medida particularmente preferida del incremento de la estabilidad biológica se pone de manifiesto por un incremento de la semivida en suero y disminución de las tasas de aclaramiento.

50 La presente invención proporciona las moléculas polinucleotídicas que codifican los anticuerpos modificados de la invención con las mutaciones descritas en el presente documento,

La presente invención proporciona los vectores que comprenden las moléculas polinucleotídicas que codifican los

anticuerpos modificados con las mutaciones (sustituciones) descritas en el presente documento.

La presente invención incluye una célula huésped que contiene dichos vectores que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, tal como se describe en el presente documento. Células huésped adecuadas para la expresión de los anticuerpos modificados descritos en el presente documento derivan de organismos procariotas, tales como *Escherichia coli*, o de organismos multicelulares eucariotas, incluidos levaduras, plantas, insectos y mamíferos.

E. coli es un huésped procariota particularmente útil para la clonación y/o expresión de las secuencias de ADN de la presente invención. Otros huéspedes microbianos adecuados para usar incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras *enterobacteriaceae*, tales como *Salmonella*, *Serratia*, y varias especies de *Pseudomonas*. En estos huéspedes procariotas, también se pueden fabricar vectores de expresión que contengan, normalmente, secuencias de control de la expresión compatibles con la célula huésped (p. ej., un origen de replicación). Además, puede haber cualquier número de diversos promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de la lactosa, u sistema promotor de triptófano (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Normalmente, los promotores controlan la expresión, opcionalmente con una secuencia operador, y tienen secuencias del sitio de unión al ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción.

Otros microbios, como levaduras, también se pueden usar para expresión. *Saccharomyces* es un huésped preferido, y los vectores tienen secuencias de control de la expresión tal como promotores, incluida 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares tal como se desee.

Se pueden usar plantas y cultivos de células vegetales para la expresión de la secuencia de ADN de la invención (Larrick y Fry, Hum. Antibodies Hybridomas 2: 172-189 (1991); Benvenuto y col., Plant Mol. Biol. 17:865-874 (1991); During y col., Plant Mol. Biol. 15:281-293 (1990); Hiatt y col., Nature 342:76-78 (1989)). Huéspedes vegetales preferibles incluyen, por ejemplo: *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica* y *Solanum tuberosum*. Un casete de expresión preferido para expresar secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos modificados de la invención es el plásmido pMOG18, en el que la secuencia de polinucleótidos insertada que codifica el anticuerpo modificado está unida operablemente al promotor CaMV 35S con un potenciador duplicado; pMOG18 se usa de acuerdo con el método de Sijmons y col., Bio/Technology 8:217-221 (1990). Como alternativa, una forma de realización preferida para la expresión de anticuerpos modificados en plantas sigue los métodos de Hiatt y col., ant., con la sustitución de las secuencias polinucleotídicas que codifican los anticuerpos modificados de la invención por las secuencias de inmunoglobulina usadas por Hiatt y col., ant. También se pueden usar vectores basados en T-ADN de *Agrobacterium tumefaciens* para expresar las secuencias de ADN de la invención; preferentemente, dichos vectores incluyen un gen marcador que codifica resistencia a espectinomycin u otro marcador seleccionable.

También se pueden usar cultivos de células de insecto para producir los anticuerpos modificados de la invención, usando normalmente un sistema de expresión basado en baculovirus. Los anticuerpos modificados se pueden producir mediante expresión de las secuencias de polinucleótidos que codifican los anticuerpos modificados de acuerdo con los métodos de Putlitz et al., Bio/Technology 8:651-654 (1990)

Además de los microorganismos y las plantas, también se pueden usar cultivos de células de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (véase, Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, New York (1987)). En realidad se prefieren las células de mamífero, ya que en la técnica se han desarrollado numerosas líneas de células huésped adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas en incluyen las líneas de células CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, preferentemente líneas celulares de mieloma etc., o células B transformadas o hibridomas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen y col., Immunol. Rev. 89:49-68 (1986)) y sitios necesarios para procesar la información, tales como sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme en ARN, sitios de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión preferidas son los promotores derivados de los genes de inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. En general, en el vector de expresión se incluye un marcador seleccionable, tal como un casete de expresión neo.

La presente divulgación proporciona un procedimiento para fabricar un agente con alteración de la afinidad de unión a FcRn y/o de la semivida en suero mediante conjugación o, de otro modo, unión de dicho agente a un resto identificado que tiene un incremento o reducción de la semivida en suero a través de su interacción con FcRn. Dicho resto incluye, entre otros, una IgG modificada o una cadena pesada parcial o completa modificada que comprende las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento. Dichos agentes incluirían, entre otros, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, hormonas, ligandos de receptores, inmunotoxinas, fármacos terapéuticos de cualquier tipo, antígenos de unión al receptor de las células T y cualquier otro agente que pueda unirse a los restos con mayor semivida en suero de la presente invención. Para crear una proteína de fusión con

alteración de la estabilidad *in vivo*, los fragmentos de ADN que codifican dichas proteínas pueden incorporarse de forma operativa en un vector recombinante, en el marco con la región constante de un anticuerpo modificado, en dirección anterior o posterior, en una posición de modo que haga que el vector sea capaz de expresar una proteína de fusión que comprende dicha proteína unida de forma operable a la región constante. Las técnicas para la manipulación de los segmentos de ADN de este modo mediante, por ejemplo, ingeniería genética usando endonucleasas de restricción, serán conocidas para los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación y de referencias tales como Sambrook y Russell, *ant.*

El procedimiento anterior se ha propuesto para usar en la generación de una serie de compuestos terapéuticos con mejor estabilidad biológica. Dichos compuestos incluyen, por ejemplo, interleuquina 2, insulina, interleuquina 4 e interferón gamma, o incluso receptores de células T. También se contempla el uso de los dominios Fc recombinantes de la presente invención también en la estabilización de una amplia gama de fármacos, que probablemente aliviarían la necesidad de repetir la administración. No obstante, los presentes procedimientos no están limitados únicamente a la producción de proteínas para administración humana y pueden emplearse para producir grandes cantidades de cualquier proteína con mayor estabilidad, de modo que se pueden usar en, por ejemplo, protocolos de inmunización, en tratamiento de animales por los veterinarios o en modelos de terapia de roedores *in vivo*.

III. Usos de anticuerpos modificados con alteración de la afinidad de unión a FcRn y/o las semividas en suero

La presente divulgación proporciona una composición que comprende los anticuerpos modificados descritos en el presente documento y un transportador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones para administración parenteral normalmente comprenden una solución del anticuerpo o un cóctel del mismo disuelto en un transportador aceptable, preferentemente un transportador acuoso. Se pueden usar varios transportadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, 0,4% de solución salina, 0,3% de glicina y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de material particulada. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables tal como se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la toxicidad y similares, por ejemplo acetato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, lactato sódico. La concentración de los anticuerpos en estas formulaciones puede variar ampliamente, es decir desde menos de aproximadamente 0,01%, normalmente al menos aproximadamente 0,1%, hasta un 5% en peso, y principalmente se seleccionan sobre la base de volúmenes de fluido y viscosidades de acuerdo con el modo concreto de administración seleccionado.

Se puede preparar una composición típica para infusión intravenosa de modo que contenga 250 ml de solución de Ringer estéril y de 10 mg a 100 mg del anticuerpo (véase, "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1980)).

Los anticuerpos modificados en la presente invención se pueden usar para varios fines no terapéuticos. Se pueden usar como agente de purificación por afinidad. También pueden ser útiles en ensayos diagnósticos, tales como la detección de la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos. Para aplicaciones diagnósticas, normalmente los anticuerpos se marcarán con un resto detectable, incluidos radioisótopos, marcadores fluorescentes y varios marcadores de sustrato enzimático. Los anticuerpos también se pueden emplear en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Los anticuerpos también se pueden usar para ensayos diagnósticos *in vivo*. En general, los anticuerpos se marcan con un radionúclido de modo que el antígeno o la célula que lo expresa se puedan localizar usando inmunocentelleo.

Asimismo se pueden suministrar kits para usar con los anticuerpos modificados en la protección contra, o la detección de, una actividad celular o la presencia de un receptor de superficie celular seleccionado o el diagnóstico de enfermedad. Por tanto, la composición sujeta de la presente invención se puede proporcionar, normalmente en forma liofilizada en un envase, bien sola o junto con anticuerpos adicionales específicos del tipo celular deseado. Los anticuerpos modificados, que pueden estar conjugados a un marcador o toxina, o sin conjugar, se incluyen en el kit con tampones tales como Tris, fosfato, carbonato etc., estabilizantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo seroalbúmina, o similares, y un grupo de instrucciones de uso. En general, estos materiales estarán presentes en menos de aproximadamente 5% en peso sobre la base de la cantidad de anticuerpo activo y, normalmente, estarán presentes en una cantidad total de al menos aproximadamente 0,001% en peso sobre la base, de nuevo, de la concentración del anticuerpo. Con frecuencia, será deseable incluir un expansor o excipiente inerte para diluir los ingredientes activos, en el que el excipiente puede estar presente en de aproximadamente 1 a 99% en peso de la composición total. Cuando en un ensayo se emplea un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo modificado, éste normalmente estará presente en un vial aparte. Normalmente, el segundo anticuerpo está conjugado con un marcador y se formula de forma análoga a las formulaciones de anticuerpo descritas en lo que

antecede.

Los anticuerpos modificados tienen varias aplicaciones terapéuticas. Los anticuerpos modificados pueden usarse para tratar a un paciente que sufra, o esté predispuesto a sufrir, una enfermedad o trastorno, que podría beneficiarse de la administración de los anticuerpos modificados. Las afecciones que se pueden tratar con los anticuerpos incluyen cáncer, afecciones inflamatorias, tales como asma, enfermedades autoinmunitarias, e infecciones virales etc.

Los tipos de cáncer que se pueden tratar con los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, cáncer de mama, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga urinaria, hepatoma, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Las enfermedades autoinmunitarias incluyen, entre otras, enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunitarias de la oreja, enfermedades autoinmunitarias del ojo, tales como uveítis, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (de tipo I), epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, miastenia gravis, pénfigo vulgar, psoriasis, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, colitis ulcerosa y vasculitis.

Los anticuerpos modificados con menores semividas en suero de la presente invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que se desea la destrucción o eliminación de tejido o de microorganismos extraños. Por ejemplo, el anticuerpo se puede usar para tratar cáncer, enfermedades inflamatorias, infecciones y otras afecciones en las que se desea la eliminación de tejido. Generalmente, el anticuerpo sería útil en cuanto a que los tiempos de aclaramiento biológico más rápidos tendrían como resultado una reducción de la inmunogenicidad de cualquier anticuerpo administrado. Otras aplicaciones incluirían regímenes de imagen basados en anticuerpos, eliminación de fármaco basado en anticuerpos o creación de inmunotoxinas con una vida más corta.

Los anticuerpos modificados con mayores semividas en suero pueden ser un anticuerpo anti-factor tisular (TF), anticuerpo anti-IgE y un anticuerpo anti-integrina. El mecanismo de acción deseado puede ser bloquear los pares de unión ligando-receptor. Los anticuerpos modificados con mayores semividas en suero pueden ser también anticuerpos agonistas. Los anticuerpos también se pueden usar como agentes terapéuticos tales como vacunas. La dosificación y frecuencia de inmunización de dichas vacunas se reducirá debido a la extensión de las semividas séricas de los anticuerpos.

Las composiciones que comprenden los presentes anticuerpos se administran por cualquier medio adecuado, incluida la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se desea, para tratamiento inmunosupresor, administración intralesional. Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, los anticuerpos se administran de forma adecuada mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes de anticuerpos.

Las composiciones que contienen los presentes anticuerpos o un cóctel de las mismas se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente ya afectado por la enfermedad concreta, en una cantidad suficiente para curar, o al menos detener parcialmente, la afección y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como una "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la afección y del estado general del propio sistema inmunológico del paciente pero, en general, varían de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de anticuerpo modificado por dosis, siendo las dosis de 1 a 10 mg por paciente más usadas.

En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los anticuerpos modificados o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que todavía no sufre la enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis profilácticamente eficaz". En este uso, las cantidades precisas dependen, de nuevo, del estado de salud del paciente y del nivel general de inmunidad, pero en general varían de 0,1 a 100 mg por dosis, especialmente dosis de 1 a 10 mg por paciente.

Se pueden llevar a cabo administraciones sencillas o múltiples de las composiciones, de las que los niveles y el patrón de dosis son seleccionados por el médico encargado del tratamiento. En cualquier caso, las formulaciones farmacéuticas proporcionarán una cantidad de los anticuerpos mutantes de la presente invención suficientes para

tratar al paciente con eficacia.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 Este ejemplo describe los vectores de expresión de anticuerpos usados en la presente invención.

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pVAg2M3-OST577, un derivado de la variante M3 de pVg2.D.Tt (Cole y col., J. Immunol. 159:3613-3621 (1997)) son los siguientes. Como se muestra en la Figura 5A, comenzando en sentido de las agujas del reloj desde el sitio EcoRI, la unidad de la cadena pesada comienza con el promotor temprano inmediato (IE) principal del citomegalovirus humano (hCMV) y el potenciador Boshart y col., Cell 41 :521-530 (1985)) como fragmento EcoRI-XbaI. Tras la región hCMV está la región OST577 V_H como fragmento XbaI, incluida la secuencia señal, el segmento J y la secuencia de corte y empalme del donante. La región V_H es seguida por un fragmento de ADN genómico modificado que contiene la región constante de la cadena pesada gamma-2M3 humana (Cole et al., op. cit.) como fragmento XbaI-BamHI, incluidos los exones C_H1, bisagra (H), C_H2, y C_H3 con los intrones intermedios, precediendo parte del intrón a C_H1, y una señal de poliadenilación (polyA) para el procesamiento de ARNm tras C_H3, seguido por el terminador de la transcripción del gen del complemento humano C2 (Ashfield y col., EM BO J. 10:4197-4207 (1991)) como fragmento BamHI-EcoRI. A la unidad de la cadena pesada le sigue un ge que codifica una forma mutante de la dihidrofolato reductasa (dhfr), junto con elementos reguladores (potenciador, promotor, señales de corte y empalme y señal de POLyA) del virus de simio 40 (SV40) necesarios para la transcripción. Esta región, que se tomó como fragmento BamHI-EcoRI del plásmido pVg1 (Co y col., op. cit.), se modificó convirtiendo el sitio BamHI en un sitio EcoRI. En dirección en contra de las agujas del reloj dentro de esta unidad desde el sitio EcoRI original, primero hay parte del plásmido pBR322 (Sutcliffe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43:77-90 (1979)) que comprende el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a ampicilina para la selección en E.coli, excepto porque el origen de replicación bacteriano se sustituyó por el correspondiente segmento de pUC 18 (Yanisch-Perron y col. Gene 33: 103-119 (1985)) para incrementar el número de copias del vector en los huéspedes bacterianos. A continuación hay un segmento de SV40 (Reddy y col., Science 200:494-502 (1978)) que contiene el potenciador y el promotor temprano de SV40 para asegurar el fuerte inicio de la transcripción. A este segmento le sigue la secuencia de dosificación del gen de dhfr de *E.coli* (Simonsen y Levinson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2495-2499 (1983)). Después del gen de la dhfr, hay un segmento de SV40 que contiene el intrón pequeño del antígeno t, que se cree que incrementa los niveles de ARNm y, después, el plásmido contiene otro segmento de SV40 que contiene una señal de poliA para terminar la transcripción del ARNm.

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pVAg1.N-OST577, un derivado de pVg1 (Co y col., op. cit.), son los siguientes. Como se muestra en la Figura 5B, en sentido de las agujas del reloj desde el sitio de EcoRI, la unidad de la cadena pesada comienza con el mismo fragmento EcoRI-XbaI que contiene el promotor IE de hCMV y el que se usó en el vector pVAg2M3-OST577, seguido por la región V_H de OST577 como fragmento XbaI. A la región V_H le sigue el fragmento de ADN genómico que contiene la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana (Ellison y col., Nucleic Acids Res 10: 4071-4079 (1982)) como fragmento XbaI-BamHI incluidos los exones C_H1, bisagra (H), C_H2 y C_H3 con los intrones intermedios, precediendo parte del intrón a Ch1 y una señal poliA para el procesamiento de ARNm tras C_H3. Para facilitar las posteriores manipulaciones de las regiones no codificadoras se usó mutagénesis por PCR de solapamiento-extensión (Higuchi, op. Cit) para crear un sitio NheI en el intrón entre los exones bisagra y C_H2. A la unidad de la cadena pesada le sigue el mismo fragmento de restricción BamHI-EcoRI que codifica la dhfr, junto con elementos reguladores y una porción del plásmido pBR22, que se usó en el vector pVAg2M3-OST577.

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena ligera pVAλ2-OST577, un derivado de pVλ (Co y col., op. cit.), son los siguientes. Como se muestra en la Figura 6, comenzando en sentido de las agujas del reloj desde el sitio EcoRI, la unidad de la cadena ligera comienza con el mismo fragmento EcoRI-XbaI que contiene el promotor IE de hCMV y el potenciador que se usaron en los vectores de cadenas pesadas, seguidos por la región V_L de OST577 como fragmento XbaI, incluida una secuencia señal, segmento J y una secuencia de corte y empalme del donante. A la región V_L le sigue un fragmento de ADN genómico que contiene la region constante de la cadena ligera del lambda-1 humano (Hieter y col., Nature 294:536-540 (1981)) como fragmento XbaI-Sau3AI que se modificó mediante PCR para codificar la region constante de la cadena ligera del lambda-2 humano (Hieter y col., ibid.), incluido el intrón de la cadena ligera de lambda 1 humano, el exón de la region constante de la cadena ligera del lambda-2 humano (Cλ2) y una porción de la región 3' no traducida de la cadena ligera del lambda-2 humano y una

señal polyA para el procesamiento de ARNm de la cadena ligera del lambda-1 humano. Tras el gen de la cadena ligera está un gen que codifica la xantina guanina fosforibosil transferasa (gpt), junto con elementos reguladores de SV40 necesarios para la transcripción. La función de esta región, que se tomó como un fragmento BamHI-EcoRI del plásmido pSV2-gpt (Mulligan y Berg, op. cit.), es proporcionar un marcador de resistencia a fármacos seleccionable tras la transfección del plásmido en células de mamífero. En dirección en contra de las agujas del reloj dentro de esta unidad desde el sitio EcoRI original, primero hay parte del plásmido pBR322 (Sutcliffe, op. cit.) que comprende el origen de replicación bacteriano y el gen de resistencia a ampicilina para la selección en *E.coli*, excepto porque el origen de replicación bacteriano se sustituyó por el correspondiente segmento de pUC 18 (Yanisch-Perron op. cit.) para incrementar el número de copias del vector en huéspedes bacterianos. A continuación hay un segmento de SV40 (Reddy y col., op. cit.) que contiene el potenciador y el promotor temprano de SV40 para asegurar el fuerte inicio de la transcripción. A este segmento le sigue la secuencia codificadora del gen gpt de *E.coli* (Richardson y col., Nucleic Acids Res. 11 :8809-8816 (1983)). Después del gen de la gpt, hay un segmento de SV40 que contiene el intrón pequeño del antígeno t, que se cree que incrementa los niveles de ARNm y, después, el plásmido contiene otro segmento de SV40 que contiene una señal de poliA para terminar la transcripción del ARNm.

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pVAg2M3-Hu1D10 (véase la Figura 7A) son idénticos a los de pVAg2M3-OST577 del que derivó, excepto porque la región V_H de OST577 se sustituyó con la región V_H de Hu1D10 del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.). Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pVAg1.N-Hu1D10 (véase la Figura 7B) son idénticos a los de pVAg1.N-OST577 del que derivó, excepto porque la región V_H de OST577 se sustituyó con la región V_H de Hu1D10 del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. *ibid*).

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pHuHCg3.Tt.D-Hu1D10 (véase la Figura 7C) son idénticos a los de pVg2.D.Tt (Cole et al., op. cit.), a excepción de que el fragmento de XbaI-BamHI que contiene la región constante de la cadena pesada gamma-2M3 humana estaba sustituida por la región V_H de Hu1D10 del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny et al. (2001), op. cit.) como fragmento XbaI, seguido de un fragmento de ADN genómico que contiene la región constante de la cadena pesada gamma-3 humana (Huck et al., Nucleic Acids Res. 14:1779-1789 (1986)) como fragmento XbaI-BamHI, incluidos los exones C_{H1} , bisagra (H), C_{H2} , y C_{H3} con los intrones intermedios, precediendo parte del intrón a C_{H1} , y una señal polyA para el procesamiento de ARNm tras C_{H3} . Los componentes del plásmido de expresión de la cadena pesada pHuHCg4.Tt.D-Hu1D10 (véase la Figura 7D) son idénticos a los de pHuHCg3.Tt.D-Hu1D10, a excepción de que la región constante de la cadena pesada de gamma-3 humana estaba sustituida por un fragmento de ADN genómico que contiene la región constante de la cadena pesada de gamma-4 humana Ellison et al., op. cit.) como fragmento XbaI-BamHI, incluidos los exones C_{H1} , bisagra (H), C_{H2} , y C_{H3} con los intrones intermedios, precediendo parte del intrón a C_{H1} , y una señal polyA para el procesamiento de ARNm tras C_{H3} .

Los componentes del plásmido de expresión de la cadena ligera pVk-Hu1D10, un derivado de pVk (Co y col., op. cit.), son los siguientes. Como se muestra en la Figura 8, en sentido de las agujas del reloj desde el sitio de EcoRI, la unidad de la cadena ligera comienza con el mismo fragmento EcoRI-XbaI que contiene el promotor IE de hCMV y el potenciador que se usó en los vectores de la cadena pesada, seguido por la región V_L de Hu1D10 (Kostelny y col. (2001), op. cit.) como fragmento XbaI, incluidas la secuencia señal, el segmento J y la secuencia de corte y empalme del donante. A la región V_L le sigue un fragmento de ADN genómico que contiene la región constante de la cadena ligera del kappa humano (Hieter et al., Cell 22:197-207 (1980)) como fragmento XbaI-BamHI, incluido el exón de la región constante de la cadena ligera de kappa humano (C_K), precediendo parte del intrón a C_K , y una señal polyA para el procesamiento de ARNm tras C_K . A la unidad de la cadena ligera le sigue el mismo fragmento BamHI-EcoRI que codifica gpt, junto con elementos reguladores necesarios para la transcripción y una porción del plásmido pBR322, que se usó en el vector pVk.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe los plásmidos usados en la presente invención.

Los ADNc de las cadenas ligera y pesada de OST577 se clonaron en su totalidad mediante PCR en una línea celular de trioma que expresa el anticuerpo OST577 anti-HBV monoclonal humano (Ehrlich y col., op. cit.). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se convirtieron mediante PCR en miniexones, flanqueados por sitios XbaI en ambos extremos, que comprenden las secuencias señal, V, (D), y segmentos J, secuencias de corte y empalme del donante y una porción de los correspondientes intrones, como se indica en Co y col., *supra*. El vector de expresión pVAg2M3-OST577 (véase en la Figura 5A), se construyó un derivado de la variante M3 de pVg2.D.Tt (Cole y col., op. cit.), sustituyendo el fragmento XbaI que contiene el miniexón OKT3- V_H con el miniexón

OST577- V_H . Después, el fragmento PciI-Fspl que contiene el origen de replicación bacteriano se sustituyó con el correspondiente fragmento PciI-Fspl de pUC18 (Yanisch-Perron y col., op. cit.) para incrementar el número de copias del vector en los huéspedes bacterianos. El vector de expresión pVAg1.N-OST577 (véase la Figura 5B), se construyó un derivado de pVg1 (Co et al., op. cit.), insertando un fragmento XbaI que contiene el minixón OST577- V_H en el sitio XbaI único de pVg1, modificando el intrón bisagra-CH2 mediante PCR de solapamiento-extensión (Higuchi, op. cit.) para crear un sitio NheI único, y sustituyendo el fragmento HindIII-XhoI que contiene el origen de replicación bacteriano con el correspondiente fragmento de HindIII-XhoI de pVAg2M3-OST577 para incrementar el número de copias del vector en los huéspedes bacterianos.

El vector de expresión p λ 2-OST577, un derivado de pV κ (Co et al., op. cit.), se construyó sustituyendo primero el fragmento XbaI-BamHI de pV κ que contiene la región constante genómica de kappa humano con un producto XbaI-BglII de la PCR que contiene la región constante genómica del lambda-1 humano. La región codificadora y una porción 3' no traducida se sustituyeron con el correspondiente fragmento del ADNc de la cadena ligera de OST577 mediante PCR, que esencialmente da un exón de la región constante genómica de lambda-2 humano. Por último, el minixón OST577- V_L se insertó en el sitio XbaI del vector. El vector de expresión p λ 2-OST577 (véase la Figura 6), un derivado de p λ 2-OST577 se construyó sustituyendo primero el fragmento SapI-Fspl que contiene el origen de replicación bacteriano con el correspondiente fragmento SapI-Fspl de pVAg2M3-OST577 para incrementar el número de copias del vector en los huéspedes bacterianos.

El vector de expresión pVAg2M3-Hu1D10 (véase la Figura 7A) se construyó sustituyendo el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg2M3-OST577, que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart et al., op. cit.) y la región V_H de OST577 con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H . El vector de expresión pVAg1.N-Hu1D10 (véase la Figura 7B) se construyó sustituyendo el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg1.N-OST577, que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.) y la región V_H de OST577 con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H .

El vector de expresión pHuHC.g3.Tt.D-Hu1D10 (véase la Figura 7C) se construyó sustituyendo el fragmento XhoI-XbaI de la variante M3 pVg2.D.Tt (Cole y col., op. cit.), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región constante de la cadena pesada de gamma-2M3 con un fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene promotor y el potenciador de hCMV y la región VH de Hu1D10 VH y un fragmento XbaI-BamHI que contiene la región constante de la cadena pesada de gamma-2M3 (Huck et al., op. cit.), respectivamente. El vector de expresión pHuHC.g4.Tt.D-Hu1D10 (véase la Figura 7D) se construyó sustituyendo el fragmento XhoI-XbaI de la variante M3 pVg2.D.Tt (Cole y col., op. cit.), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región constante de la cadena pesada de gamma-2M3 con un fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene promotor y el potenciador de hCMV y la región VH de Hu1D10 VH y un fragmento XbaI-BamHI que contiene la región constante de la cadena pesada de gamma-4 (Ellison et al., op. cit.), respectivamente.

El vector de expresión pV κ -Hu1D10 (véase la Figura 8) se construyó sustituyendo el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pV κ (Co y col., op. cit.), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.) con el fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.lgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región V_L de Hu1D10.

El vector de expresión base pDL172, un derivado de pVkrG (Cole y col., op. cit.), se construyó sustituyendo el fragmento XbaI-SphI que contiene la región constante genómica de kappa humano con un fragmento XbaI-SphI compuesto por un fragmento XbaI-NheI que contiene la porción N-terminal de la secuencia señal de la cadena pesada de M195 (Co et al., op. cit.), un fragmento NheI-AgeI de 0,7 kb, un fragmento AgeI-EagI sintético que codifica un decapeptido c-myc humano, flanqueado por péptidos ligadores, que es reconocido por el anticuerpo monoclonal de ratón 9E10 (Evan y col., Mol. Cell. Biol. 5:3610-3616 (1985)), seguido por la señal de unión GPI del factor de aceleración humano (Caras y col., Nature 325:545-549 (1987)), y un fragmento EagI-SphI que contiene la señal polyA del gen de la inmunoglobulina gamma 1 humana (Ellison y col., op. cit.).

Los dominios de microglobulina beta-2 humana (β_2m) y extracelular del gen de la cadena alfa del receptor Fc neonatal humano FcRn se clonaron mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc preparada con células mononucleares de sangre periférica. El gen de la cadena alfa de FcRn humano se modificó mediante PCR para añadir un sitio NheI flanqueante y la porción C-terminal de la secuencia señal de la cadena pesada de M195 (Co et al., op. cit.) en el extremo 5' y un sitio AgeI flanqueante en el extremo 3' y se usó para sustituir el fragmento NheI-AgeI de pDL172, lo que da como resultado el vector de expresión pDL172 +HuFcRn. El gen de β_2m humana se

modificó mediante PCR para añadir sitios XbaI y SalI flanqueantes en los extremos 5' y 3', respectivamente, y para eliminar un sitio EcoRI interno. El fragmento XbaI-SalI resultante se subclonó en un vector intermedio, flanqueado en su extremo 5' por un fragmento EcoRI-XbaI que contiene el promotor IE y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.), y, en su extremo 3', por el fragmento SalI-BamHI que contiene la señal de poliadenilación del gen de la inmunoglobulina gamma-2a murina (Kostelny y col. (1992), op. cit.), seguido por un fragmento BamHI-EcoRI que contiene el terminador de la transcripción del gen C2 del complemento humano (Ashfield y col., op. cit.). El fragmento EcoRI-EcoRI resultante que contiene una unidad transcripcional humana funcional se clonó en el sitio EcoRI único de pDL172 + HuFcRn, lo que tiene como resultado el vector de expresión pDL172 + HuFcRn + Huβ2m, en lo sucesivo denominado pDL208 (véase la Figura 9A).

Los dominios β2m de rhesus y extracelular de la cadena alfa de FcRn de rhesus se clonaron mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de células mononucleares de sangre periférica de rhesus. El gen β2m de rhesus se modificó mediante PCR para añadir sitios XbaI y SalI flanqueantes en los extremos 5' y 3', respectivamente, y para eliminar un sitio EcoRI interno. El fragmento XbaI-SalI resultante se subclonó en un vector intermedio, flanqueado en su extremo 5' por un fragmento EcoRI-XbaI que contiene el promotor IE y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.), y, en su extremo 3', por el fragmento SalI-BamHI que contiene la señal de poliadenilación del gen de la inmunoglobulina gamma-2a murina (Kostelny y col. (1992), op. cit.), seguido por un fragmento BamHI-EcoRI que contiene el terminador de la transcripción del gen C2 del complemento humano (Ashfield y col., op. cit.). El fragmento EcoRI-EcoRI resultante que contiene una unidad transcripcional funcional de β2m de rhesus se usó para sustituir el fragmento EcoRI-EcoRI (que contiene la unidad transcripcional de β2m humana) de pDL172 + HuFcRn + Huβ2m, lo que tiene como resultado pDL172 + HuFcRn + Rhβ2m. El gen de la cadena alfa de FcRn de rhesus se modificó mediante PCR para añadir un sitio NheI flanqueante y la porción C-terminal de la secuencia señal de la cadena pesada de M195 (Co et al., op. cit.) en el extremo 5' y un sitio agel flanqueante en el extremo 3' y se usó para sustituir el fragmento NheI-Agel (que contiene el gen de la cadena alfa de FcRn humano) de pDL172 + HuFcRn + Rhβ2m, lo que tiene como resultado el vector de expresión pDL172 + RhFcRn + Rhβ2m, en lo sucesivo denominado Pdl410 (véase la figura 9B).

Ejemplo 3

Este ejemplo describe la mutagénesis de la región Fc del gen de la cadena pesada γ2M3 humana

Modelización molecular:

Se generó un modelo inicial del complejo Fc/FcRn humano sobre la base de una estructura de cristal de baja resolución del complejo Fc/FcRn de rata (Burmeister y col., Nature 372:379-383 (1994); RCSB protein databank code 1FRT). En primer lugar, la β2m de rata del complejo se sustituyó mediante superposición de la β2m humana tomada de una estructura de cristal de alta resolución del antígeno HLA-A1 de histocompatibilidad humano (Saper y col. J. Mol. Biol. 219:277-319 (1991); RCSB code 3HLA) en la misma orientación que la de la rata en el complejo. A continuación, la cadena alfa del FcRn de rata se sustituyó con superposición de la cadena alfa humana tomada de una estructura de cristal de alta resolución del FcRn humano West and Bjorkman, Biochemistry 29:9698-9708 (2000); RCSB code 1EXU) en la misma orientación que la cadena alfa de la rata en el complejo. Después, los residuos de rata en el Fc del complejo se sustituyeron con los correspondientes residuos del Fc de la IgG1 humana (Kabat et al., op. cit.) y se realizaron cálculos de minimización de energía usando los programas SEGMOD y ENCAD (Levitt, J. Mol. Biol. 226:507-533 (1992); Levitt, J. Mol. Biol. 168:595-620 (1983)) para producir un modelo de complejo Fc/FcRn de IgG1 humana. Por último, los residuos de Fc de la IgG1 del modelo se sustituyeron con los correspondientes residuos de la Fc de IgG2M3 Cole et al., op. cit.) y se repitieron los cálculos de minimización de energía para producir un modelo de complejo Fc/FcRn de IgG2M3 humana, en lo sucesivo denominado modelo 1.

Se generó un segundo modelo del complejo Fc/FcRn de IgG2M3 humana tal como se ha descrito en lo que antecede, sobre la base de un modelo del complejo Fc/FcRn de rata (Weng et al., J. Mol. Biol. 282:217-225 (1998); RCSB code 2FRT), en lo sucesivo denominado modelo 2.

Se generó un tercer modelo tal como se ha descrito en lo que antecede, sobre la base de una estructura de cristal de alta resolución de un complejo fc/FcRn heterodimérico de rata (Martin y col., Mol. Cell 7:867-877 (2001); RCSB code 1/1 A), en lo sucesivo denominado modelo 3.

Mutagénesis:

Se usó el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con solapamiento-extensión (Higuchi, op. cit.) para generar sustituciones aleatorias de aminoácidos en las posiciones 250, 314 y 428 de la cadena pesada de OST577-IgG2M3 (numerado de acuerdo con el índice de UE de Kabat y col., op. cit.). Para generar mutantes aleatorios en la posición 250, se usaron los cebadores de mutagénesis JY24 (5' GAC CTC AGG GGT CCG GGA

GAT CAT GAG MNN GTC GG -3') (SEC ID N° 77) y JY25 (5' -CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC -3') (SEC ID N° 78), en los que M = A o C, y N = A, C, G o T. El primer ciclo de PCR de solapamiento-extensión usó el cebador externo msc g2-1 (5' -CCA GCT CTG TCC CAC ACC G -3') (SEC ID N° 79) Y JY24 para el fragmento izquierdo y el cebador externo kco8 (5'-GCC AGG ATC CGA CCC ACT -3') (SEC ID N° 80) y JY25 para el fragmento derecho. La reacción de PCR se realizó usando el sistema de PCR Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN), siguiendo las recomendaciones del fabricante, mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 55°C durante 5 segundos y 72°C durante 60 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos en un GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Los productos de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se escindieron del gel y se fundieron a 70°C. El segundo ciclo de PCR para combinar los fragmentos izquierdo y derecho se realizó como se ha descrito en lo que antecede, usando los cebadores externos msc g2-1 y kco8 durante 35 ciclos. Los productos finales de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado y se purificaron usando el kit de extracción QIAEX™ II Gel Extraction Kit (QIAGEN®, Valencia, CA). Los fragmentos purificados se digirieron con PinAI y BamHI, se purificaron en gel como se ha descrito en lo que antecede y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg2M3-OST577.

Para generar los mutantes T2501 and T250L, se usaron los cebadores de mutagénesis KH4 (5'-GAC CTC AGG GGT CCG GGA GAT CAT GAG AAK GTC GG -3') (SEC ID N° 81) y KH3 (5' -CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC -3') (SEC ID N° 82), en los que K = G o T. Para generar los mutantes T250C y T250G, se usaron los cebadores de mutagénesis KH5 (5'-GAC CTC AGG GGT CCG GGA GAT CAT GAG GCM GTC GG -3') (SEC ID N° 83) y KH3, en los que M = A o C. Para generar los mutantes T250N y T250Q, se usaron los cebadores de mutagénesis KH6 (5'-GAC CTC AGG GGT CCG GGA GAT CAT GAG NTK GTC GG -3') (SEC ID N° 84) y KH3, en los que K = G o T, y N = A, C, G o T. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo msc g2-1 y KH4, KH5 o KH6 para el fragmento izquierdo y el cebador externo MGD-1 (5'-GCC AGG ATC CGA CCC ACT -3') (SEC ID N° 85) y KH3 para el fragmento derecho. Las reacciones de PCR se realizaron usando el sistema Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation) mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguidos por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 60 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se escindieron del gel y se fundieron a 70°C. El segundo ciclo de PCR para combinar los fragmentos izquierdo y derecho se realizó como se ha descrito en lo que antecede, usando los cebadores externos msc g2-1 y MGD-1, mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 60 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos finales de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado y se purificaron usando el kit de extracción QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Los fragmentos purificados se digirieron con PinAI y BamHI, se purificaron en gel como se ha descrito en lo que antecede y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg2M3-OST577.

Para generar mutantes aleatorios en la posición 314, se usaron los cebadores de mutagénesis kc078 (5' -ACC GTG CAC CAG GAC TGG NNK AAC GGC AAG GAG -3') (SEC ID N° 86) y kc079 (5'-CCA GTC CTG GTG CAC AAC GG -3') (SEC ID N° 87), en los que K = G o T, y N = A, C, G o T. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo ks g2-5 (5' -CTC CCG GAC CCC TGA GGT C -3') (SEC ID N° 88) y kc079 para el fragmento izquierdo y el cebador externo kco8 y kc078 para el fragmento derecho. Todas las etapas posteriores se realizaron como se ha descrito en lo que antecede para la mutagénesis aleatoria en la posición 250, excepto porque el segundo ciclo de PCR usó cebadores externos ks g2-5 y kco8, y los fragmentos finales de la PCR se digirieron con PmlI y BamHI y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg2M3-OST577.

Para generar el mutante L3141, se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-10 (5'-ACC GTG CAC CAG GAC TGG ATC AAC GGC AAG GA -3') (SEC ID N° 89) y kc079. Para generar el mutante L314Y, se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-11 (5'-ACC GTG CAC CAG GAC TGG TAT AAC GGC AAG GA -3') (SEC ID N° 90) y kc079. Para generar el mutante L314H, se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-12 (5'-ACC GTG CAC CAG GAC TGG CAC AAC GGC AAG GA -3') (SEC ID N° 91) y kc079. Para generar el mutante L314M, se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-13 (5'-ACC GTG CAC CAG GAC TGG ATG AAC GGC AAG GA -3') (SEC ID N° 92) y kc079. Para generar el mutante L314N, se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-14 (5'-ACC GTG CAC CAG GAC TGG AAT AAC GGC AAG GA -3') (SEC ID N° 93) y kc079. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo jt240 (5'-GGA CAC CTC TCC TCC C -3') (SEC ID N° 94) y kc079 para el fragmento izquierdo y el cebador externo kc041 (5'-CTA GTG GtTGT CC -3') (SEC ID N° 95) y MGD-10, MGD-11, MGD-12, MGD-13 o MGD14 para el fragmento derecho. Las reacciones de PCR se realizaron usando el sistema Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation) mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguidos por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 60 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se escindieron del

gel y se fundieron a 70°C. El segundo ciclo de PCR para combinar los fragmentos izquierdo y derecho se realizó como se ha descrito en lo que antecede, usando los cebadores externos jt240 y kc041, mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 60 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos finales de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado y se purificaron usando el kit de extracción QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Los fragmentos purificados se subclonaron en pCR®4Blunt-TOPO® (Invitrogen™, Carlsbad, CA), después se digirieron con PmlI y BamHI, se purificaron en gel como se ha descrito en lo que antecede y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg2M3-OST577.

Para generar mutantes aleatorios en la posición 428, se usaron los cebadores de mutagénesis JY22 (5'-GAA CGT CTC ATG CTC CGT GNN KCA TGA GGC TCT G -3') (SEC ID N° 96) y JY23 (5'-CAC GGA GCA TGA GM GAC C-3') (SEC ID N° 97), en los que K = G o T, y N = A, C, G o T. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo ks g2-5 y JY23 para el fragmento izquierdo y el cebador externo kco8 y JY22 para el fragmento derecho. Todas las etapas posteriores se realizaron como se ha descrito en lo que antecede para la mutagénesis aleatoria en la posición 314.

Para generar mutantes aleatorios en la posición 428, posteriormente se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-2 (5'-GTG TAG TGG TGC AGA GCC TCA TGM NNC ACG GAG CAT GAG AAG -3') (SEC ID N° 98) y KH1 (5'-CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC AC -3') (SEC ID N° 99), en los que M = A o C, y N = A, C, G o T. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo msc g2-1 y MGD-2 para el fragmento izquierdo y el cebador externo MGD-1 y KH1 para el fragmento derecho. La reacción de PCR se realizaron usando el sistema Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation) mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguidos por 25 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 90 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se escindieron del gel y se fundieron a 70°C. El segundo ciclo de PCR para combinar los fragmentos izquierdo y derecho se realizó como se ha descrito en lo que antecede, usando los cebadores externos msc g2-1 y MGD-1, mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 5 segundos, 60°C durante 5 segundos y 72°C durante 75 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos. Los productos finales de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado y se purificaron usando el kit de extracción QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Los fragmentos purificados se digirieron con PinAI y BamHI, se purificaron en gel como se ha descrito en lo que antecede y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg2M3-OST577.

Para generar el mutante M428E se usaron los cebadores de mutagénesis MGD-8 (5'-GTG TAG TGG TGC AGA GCC TCA TGT TCC ACG GAG CAT GAG AAG -3') (SEC ID N° 100) y KH1. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo msc g2-1 y MGD-8 para el fragmento izquierdo y el cebador externo MGD-1 y KH1 para el fragmento derecho. Todas las etapas posteriores se realizaron como se ha descrito en lo que antecede para la mutagénesis aleatoria en la posición 428.

El mutante doble T250E/M428F se generó sustituyendo el fragmento PmlI-BamHI en el plásmido pVAg2M3-OST577 que contiene la mutación T250E con el correspondiente fragmento PmlI-BamHI del plásmido pVAg2M3-OST577 que contiene la mutación M428F. Los mutantes dobles T250Q/M428F y T250Q/M428L se generaron sustituyendo el fragmento PmlI-BamHI en el plásmido pVAg2M3-OST577 que contiene la mutación T250Q con el correspondiente fragmento PmlI-BamHI de los plásmidos pVAg2M3-OST577 que contienen las mutaciones M428F y M428L, respectivamente.

También se crearon varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada Hu1D10-IgG2M3. Para generar el mutante M428L, el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg2M3-OST577 (M428L), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart et al., op. cit.) y la región V_H de OST577 se sustituyó con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.IgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H. Para generar el mutante T250Q/M428L, el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg2M3-OST577 (T250Q/M428L), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart et al., op. cit.) y la región V_H de OST577 se sustituyó con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.IgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H.

El ADN plasmídico se preparó usando el kit QIAprep™ Spin Miniprep Kit (QIAGEN®) y las sustituciones de nucleótidos se identificaron mediante secuenciación. Las preparaciones de ADN plasmídico a gran escala se realizaron usando el EndoFree® Plasmid Maxi Kit (QIAGEN®). Las regiones codificadoras de los plásmidos de expresión OST577-IgG2M3 se verificaron mediante secuenciación de nucleótidos.

Resultados:

Con el fin de aislar mutantes de IgG humanas con mayor o menor afinidad por el receptor Fc neonatal (FcRn), que cabría esperar que tuvieran alteradas las semividas en suero, se generaron sustituciones aleatorias de aminoácidos en las posiciones 250, 314 y 428 de la cadena pesada de γ 2M3 (numerados de acuerdo con el índice UE de Kabat y col., op. cit.). Estas tres posiciones se escogieron sobre la base de modelación por ordenación de un complejo de la Fc de IgG2M3 humano y del FcRn humano (véanse los modelos 1, 2 y 3, que se han descrito antes en el Ejemplo), que se dedujo a partir de la estructura de cristal por rayos X del complejo Fc/FcRn de rata (Burmeister y col., op. cit.). Aunque los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 250, 314 y 428 se localizan cerca de la interfaz Fc/FcRn, estos residuos no parecen contribuir directamente a la interacción dependiente de pH entre Fc y FcRn. Por tanto, las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones pueden incrementar (o disminuir) la afinidad de Fc por FcRn manteniendo la unión dependiente de pH. Entre los mutantes sencillos generados mediante mutagénesis por PCR se observaron 19 mutantes que convirtieron la T salvaje en la posición 250 en A, C, O, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y; 19 mutantes que convirtieron la L salvaje en la posición 314 en A, C, O, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; 19 mutantes que convirtieron la M salvaje en la posición 428 en A, C, O, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y (véase la Tabla 1). Algunos de los mutantes sencillos con mayor unión a FcRn se combinaron para generar varios mutantes dobles, incluidos T250E/M428F, T250Q/M428F, y T250Q/M428L.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la mutagénesis de la región Fc del gen de la cadena pesada γ 1 humana

Mutagénesis:

Se usó el procedimiento de PCR con solapamiento-extensión (Higuchi, op. cit.) para generar sustituciones aleatorias de aminoácidos en las posiciones 250, 314 y 428 de la cadena pesada de OST577-IgG1 (numerado de acuerdo con el índice de UE de Kabat y col., op. cit.). Para generar el mutante T250E, se usaron los cebadores para mutagénesis JX076 (5' -AAC CCA AGG ACG AAC TCA TGA TCT CCC G -3') (SEC ID N° 101) y JX077 (5' -GGA GAT CAT GAG TTC GTC CTT GGG TG -3') (SEC ID N° 102). El primer ciclo de PCR de solapamiento—extensión usó el cebador externo JX080 (5' -CCT CAG CTC GGA CAC cn CTC -3') (SEC ID N° 103) y JX077 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 (5' -GCC TCC CTC ATG CCA CTC A-3') (SEC ID N° 104) y JX076 para el fragmento derecho. La reacción de PCR se realizó usando el sistema de PCR Expand™ High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics Corporation), siguiendo las recomendaciones del fabricante, mediante incubación a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 20 segundos y 72°C durante 90 segundos, seguido por incubación a 72°C durante 7 minutos en un GeneAmp® PCR System 9600 (Applied Biosystems®). Los productos de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se escindieron del gel y se fundieron a 70°C. El segundo ciclo de PCR para combinar los fragmentos izquierdo y derecho se realizó como se ha descrito en lo que antecede, usando los cebadores externos JX080 y NT244 durante 35 ciclos. Los productos finales de la PCR se pasaron por un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se escindieron los fragmentos de ADN del tamaño esperado y se purificaron usando el kit de extracción QIAquick™ II Gel Extraction Kit (QIAGEN®). Los fragmentos purificados se digirieron con NheI and EagI, se purificaron en gel como se ha descrito en lo que antecede y se clonaron entre los sitios correspondientes en pVAg1.N-OST577.

Para generar el mutante T250D, se usaron los cebadores para mutagénesis JX087 (5' -AAC CCA AGG ACG ACC TCA TGA TCT CCC G -3') (SEC ID N° 105) y JX088 (5' -GGA GAT CAT GAG GTC GTC cn GGG TG -3') (SEC ID N° 106). El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JX088 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 y JX087 para el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se realizaron como se ha descrito en lo que antecede.

Para generar el mutante M428F, se usaron los cebadores para mutagénesis JX078 (5'-CTC ATG CTC CGT GnCCATGAGGC TCT GC -3') (SEC ID N° 107) y JX079 (5' -AGA GCC TCA TGG AAC ACG GAG CAT GAG -3') (SEC ID N° 108). El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JX079 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 y JX078 para el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se realizaron como se ha descrito en lo que antecede.

Para generar el mutante M428L, se usaron los cebadores para mutagénesis JXM428L1 (5' -CTCATG CTC CGTGnGCATGA GGC TCT GC -3') (SEC ID N° 109) y JXM428L2 (5' -AGA GCC TCA TGC AAC ACG GAG CAT GAG -3') (SEC ID N° 110). El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JXM428L2 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 y JXM428L1 para el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se realizaron como se ha descrito en lo que antecede.

Para generar el mutante T250Q, se usaron los cebadores para mutagénesis JXT250Q1 (5' -AAC CCA AGG ACC AAC TCA TGA TCT CCC G -3') (SEC ID N° 111) y JXT250Q2 (5' -GGA GAT CAT GAG TTG GTC CTT GGG TTT TG -3') (SEC ID N° 112). El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JXT250Q2 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 y JXT250Q1 para el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se

5

Para generar el mutante doble T250E/M428F se usaron los cebadores para mutagénesis JX076 y JX077 para crear la mutación T250E en un molde que contiene la mutación M428F. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JX077 para el fragmento izquierdo y el cebador externo NT244 y JX076 para el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se realizaron como se ha descrito en lo que antecede.

10 Para generar el mutante doble T250Q/M428L se usaron los cebadores para mutagénesis JXT250Q1 y JXT250Q2 para crear la mutación T250Q y los cebadores para mutagénesis JXM428L1 y JXM428L2 para crear la mutación M428L. El primer ciclo de PCR usó el cebador externo JX080 y JXT250Q2 para crear el fragmento izquierdo, JXT250Q1 y JXM428L2 para crear el fragmento medio y el cebador externo NT244 y JXM428L1 para crear el fragmento derecho. Todas las etapas siguientes se realizaron como se ha descrito en lo que antecede.

15 También se crearon varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada Hu1D10-IgG1. Para generar el mutante M428L, el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg1.N-OST577 (M428L), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.) y la región V_H de OST577 se substituyó con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.IgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H. Para generar el mutante T250Q/M428L

20 , el fragmento XhoI-XbaI del plásmido pVAg1.N-OST577 (T250Q/M428L), que contiene el promotor y el potenciador de hCMV (Boshart y col., op. cit.) y la región V_H de OST577 se substituyó con el correspondiente fragmento de XhoI-XbaI del plásmido pHu1D10.IgG1.rgpt.dE (Kostelny y col. (2001), op. cit.) que contiene el promotor y el potenciador de hCMV y la región Hu1D10 V_H.

25 El ADN plasmídico se preparó usando el kit QIAprep™ Spin Miniprep Kit (QIAGEN®) y las sustituciones de nucleótidos se confirmaron mediante secuenciación. Las preparaciones de ADN plasmídico a gran escala se realizaron usando el EndoFree™ Plasmid Maxi Kit (QIAGEN®). Las regiones codificadoras de los plásmidos de expresión OST577-IgG1 se verificaron mediante secuenciación de nucleótidos.

Resultados:

30 Con el fin de identificar mutantes de IgG humanas con alteración de la afinidad por el receptor Fc neonatal (FcRn), que cabría esperar que tuvieran alteradas las semividas en suero, se generaron varias sustituciones de aminoácidos en las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada de γ 1 (numerados de acuerdo con el índice UE de Kabat y col., op. cit.). Estas dos posiciones se escogieron sobre la base de la identificación de mutaciones en estas posiciones en la cadena pesada γ 2M3 que tuvo como resultado un aumento o disminución de la unión a FcRn. Aunque los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones 250 y 428 se localizan cerca de la interfaz Fc/FcRn, estos

35 residuos no parecen contribuir directamente a la interacción dependiente de pH entre Fc y FcRn. Por tanto, las sustituciones de aminoácidos en estas posiciones pueden incrementar (o disminuir) la afinidad de Fc por FcRn manteniendo la unión dependiente de pH. Tanto los mutantes sencillos como los dobles que exhibieron incremento de la unión en el contexto de la cadena pesada γ 2M3 humana se evaluaron en la cadena pesada γ 1 humana, incluidos los mutantes sencillos T250E, T250Q, M428F, y M428L, y los mutantes dobles T250E/M428F y

40 T250Q/M428L. Un mutante sencillo que exhibió disminución de la unión en el contexto de la cadena pesada γ 2M3 humana (T250D) también se evaluó en la cadena pesada γ 1 humana.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe la caracterización de anticuerpos mutantes IgG2M3 e IgG1

Cultivo celular:

45 La línea de células de riñón humano 293H (Life Technologies®, Rockville, MD) se mantuvo en DMEM (BioWhittaker™, Walkersville, MD) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) (HyClone®, Logan, UT), 0,1 mM de MEM aminoácidos no esenciales (Invitrogen™) y L-glutamina 2 mM (Invitrogen™), en lo sucesivo denominado medio 293, a 37°C en incubador a 7,5% de CO₂. Para la expresión y purificación de anticuerpos monoclonales tras transfección transitoria, las células 293-H se incubaron en DMEM que contenía 10% de FBS con bajos niveles de

50 IgG (HyClone®), 0,1 mM de MEM aminoácidos no esenciales y L-glutamina 2 mM, en lo sucesivo denominado medio 293 pobre en IgG. La línea celular de mieloma de ratón Sp2/0 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassus, VA) se mantuvo en DMEM con 10% de FBS y L-glutamina 2 mM. Para la purificación de los anticuerpos

monoclonales tras transfección estable, las células Sp2/0 se adaptaron a crecer en Hibridoma-SFM (Life Technologies®).

Transfecciones transitorias:

Las células 293-H se co-transfeccionaron de forma transitoria con el adecuado plásmido de cadena ligera y el adecuado plásmido salvaje o uno de los diversos plásmidos de cadena pesada mutada, que contienen una única o doble sustitución en la posición 250, 314 o 428. Para las transfecciones transitorias a pequeña escala, aproximadamente 1×10^6 células por transfección se sembraron en una placa de 6 pocillos en 3 ml de medio 293 y se cultivaron durante la noche hasta la confluencia. Al día siguiente, 2 µg del plásmido de cadena ligera y 2 µg del plásmido salvaje o de cadena pesada mutada se combinaron con 0,25 ml de HSFM. En un tubo aparte, 10 µl de reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™) y 0,25 ml de HSFM se combinaron e incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de 0,25 ml de Lipofectamine™ 2000-HSFM se mezcló suavemente con la mezcla de 0,25 ml de ADN-HSFM y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El medio que cubría las células 293-H se aspiró y se sustituyó con medio 293 pobre en IgG, después, gota a gota se añadieron a las células los complejos lipofectamina-ADN, se mezclaron suavemente mediante movimientos giratorios y las células se incubaron durante 5-7 días a 37°C en un incubador con 7,5% de CO₂ antes de recoger los sobrenadantes.

Para las transfecciones transitorias a gran escala, aproximadamente 7×10^6 células por transfección se sembraron en un matraz T-75 en 25 ml de medio 293 y se cultivaron durante la noche hasta la confluencia. Al día siguiente, 12 µg del plásmido de cadena ligera y 12 µg del plásmido salvaje o de cadena pesada mutada se combinaron con 1,5 ml de HSFM. En un tubo aparte, 60 µl de reactivo Lipofectamine™ 2000 y 1,5 ml de HSFM se combinaron e incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de 1,5 ml de Lipofectamine™ 2000-HSFM se mezcló suavemente con la mezcla de 1,5 ml de ADN-HSFM y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. El medio que cubría las células 293-H se aspiró y se sustituyó con medio 293 pobre en IgG, después, gota a gota se añadieron a las células los complejos lipofectamina-ADN, se mezclaron suavemente mediante movimientos giratorios y las células se incubaron durante 5-7 días a 37°C en un incubador con 7,5% de CO₂ antes de recoger los sobrenadantes.

Concentración de anticuerpos:

Los sobrenadantes de las transfecciones a pequeña escala se recogieron mediante centrifugación a ~ 1.200 rpm durante 5 minutos y se filtraron en esterilidad usando microfiltros de 0,22 µm MilleX®-GV (Millipore® Corporation, Bedford, MA). Las muestras se concentraron aproximadamente 6 veces hasta 0,5 ml usando concentradores de 6 ml Vivaspin® (50.000 MWCO) (Vivascience® AG, Hannover, Alemania) mediante centrifugación a 3.000 rpm. Las muestras proteicas concentradas se resuspendieron en 5 ml de PBS, Ph 6,0 y se concentraron hasta un volumen de 0,5 ml como se ha descrito en lo que antecede. Se usó el procedimiento de ELISA que se describe más adelante para medir la concentración de anticuerpo en cada muestra.

Transfecciones estables:

Las células Sp2/0 se transfeccionaron de forma estable con el adecuado plásmido de cadena ligera y el adecuado plásmido salvaje o uno de los diversos plásmidos de cadena pesada mutada, que contienen una única o doble sustitución en la posición 250 o 428. Aproximadamente 1×10^7 células se lavaron con 10 ml de PBS y se resuspendieron en 1 ml de PBS. Aproximadamente 25-30 µg del plásmido de cadena ligera y 50-60 µg del plásmido de cadena pesada se linealizaron con FspI y se añadieron a las células. Las células y el ADN se mezclaron suavemente y se transfirieron a un Gene Pulser Cuvette (Bio-Rad® Laboratories, Hercules, CA) en hielo. Las células se sometieron a electroporación usando un Gene Pulser II (Bio-Rad® Laboratories) fijado a 0,360 kV. 25 µF, y se devolvieron al hielo durante 10-20 minutos. Las células se diluyeron en 40 ml de DMEM, 10% de FBS, L-glutamina 2 mM y se sembraron en cuatro placas de 96 pocillos a 100 µl/pocillo. Después de 48 horas, se añadieron 100 µl/pocillo de 2 x medio de selección con ácido micofenólico (MPA) (DMEM, 10% FBS, 1X HT Media Supplement Hybri-MaX® (Sigma®, St. Louis, MO), 300 µg/ml de xantina Sigma®), 2 µg/ml de ácido micofenólico (Life Technologies®) y L-glutamina 2 mM) Los sobrenadantes de los pocillos que aparentemente contenían colonias sencillas se sometieron a ELISA tras 10-14 días. Los clones productores de más anticuerpos se escogieron para expansión y adaptación a HSFM (Life Technologies®). Los clones adaptados se expandieron a frascos rotatorios en 450 ml de HSFM, se gasificaron con 5% de CO₂ en aire, se suplementaron tras 2 días con 50 ml de medio de alimentación 2 sin proteínas (PFFM-2) (Sauer et al., Biotechnol. Bioeng. 67:585-597 (2000)), y se cultivaron hasta agotamiento.

Algunos de los clones más productores de anticuerpos también se adaptaron al medio 1 basal sin proteínas (PFBM-1) (Protein Design Labs™, Inc.), se expandieron a matraces giratorios de 10 l, se suplementaron tras 2 días con un volumen de 1/10 de PFFM-2 y se cultivaron hasta agotamiento.

ELISA:

Para cuantificar la cantidad de anticuerpo OST577 o Hu1D10 presente en los sobrenadantes de los cultivos se realizó un ELISA. 4 placas Immulon™ (DYNEX® Technologies, Inc., Chantilly, VA) se revistieron durante la noche a 4°C con 1,0 µg/ml de anticuerpo de cadena gamma de IgG anti-humano de F(ab')₂ de cabra (BioSource International, Camarillo, CA) o anticuerpo específico del fragmento Fcγ de IgG anti-humano de cabra o AffiniPure™ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) en 100 µl/pocillo de tampón carbonato-bicarbonato 0,2M, pH 9,4. Al día siguiente, las placas se lavaron con tampón de lavado de ELISA (EWB) (PBS, 0,1% DE Tween 20) y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo SuperBlocik® en TBS (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) durante 20-30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con EWB y muestras de ensayo diluidas adecuadamente se añadieron a cada pocillo. Los anticuerpos OST577 o Hu1D10 purificados, según lo adecuado, se diluyeron en serie dos veces en 100 µl/pocillo de tampón de ELISA (EB) (PBS, 1% de soroalbúmina bovina, 0,1% de Tween 20) comenzando a 0,2 µg/ml de EB y se usaron como patrones. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron inicialmente a 1:10 en 100 µl/pocillo de EB, después se diluyeron en serie dos veces en 100 µl/pocillo de EB. Las placas se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente, después se lavaron con EWB y se añadieron 100 µl/pocillo del anticuerpo conjugado con HRP de la cadena ligera de lambda anti-humano de cabra ((BioSource International, o Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL) o del anticuerpo conjugado con HRP de la cadena ligera de kappa anti-humano de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.), según sea adecuado, a 1,0 µg/ml en EB. Tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se lavaron con EWB, seguido por la adición de 100 µl/pocillo de ABTS sustrato peroxidasa/solución B de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de 2% de ácido oxálico y se midió la absorbancia a 415 nm usando un lector de placas de microtitulación VERSAmax™ (Molecular Devices Corporation®, Sunnyvale, CA).

Purificación de anticuerpos:

Los sobrenadantes de los cultivos de transfecciones transitorias se recogieron mediante centrifugación y se filtraron en esterilidad. El pH de los sobrenadantes filtrados se ajustó mediante la adición de un volumen 1/50 de citrato sódico 1M, Ph 7,0. Los sobrenadantes se pasaron por una columna de HP de proteína A de 1 ml HiTrap® (Amersham Biosciences™ Corporation, Piscataway, NJ) que se pre-equilibró con citrato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. La columna se lavó con el mismo tampón y el anticuerpo unido eluyó con citrato sódico 20 mM, pH 3,5. Tras neutralizar mediante la adición de un volumen de 1/50 de citrato sódico 1,5M, pH 6,5, las fracciones combinadas de anticuerpos se pasaron por una columna de 5 ml HiTrap® Desalting (Amersham Biosciences™ Corporation) que se pre-equilibró con citrato sódico 20 mM, NaCl 120 mM, pH 6,0. El caudal se recogió y las fracciones se con DO280 > 0,1 se combinaron y concentraron hasta ~ 0,5-1,0 mg/ml usando concentradores de 2 ml Vivaspin® (50.000 dalton MWCO) (Vivascience® AG). Después, las muestras se filtraron en esterilidad usando microfiltros de 0,2 µm Millex®-GV (Millipore® Corporation) Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron mediante espectroscopia UV midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml= 1,4 A₂₈₀).

Para la purificación a pequeña escala de los anticuerpos de transfecciones estables, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos mediante centrifugación y se filtraron en esterilidad. Los sobrenadantes se pasaron por una columna de proteína A de 5 ml POROS® 50A (Applied Biosystems®) pre-equilibrada con PBS, pH 7,4- La columna se lavó con el mismo tampón y el anticuerpo unido eluyó con glicina 0,1 mM, NaCl 0,1M pH 3,0. Tras neutralizar mediante la adición de un volumen de 1/20 de base Tris 1M, las fracciones combinadas se intercambiaron con tampón en PBS, Ph, 7,4, usando una columna de desalación PD-10 (Amersham Biosciences™ Corporation) o mediante diálisis. Después, las muestras se filtraron en esterilidad usando microfiltros de 0,2 µm Millex®-GV (Millipore® Corporation) Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron mediante espectroscopia UV midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml= 1,4 A₂₈₀).

Para la purificación a gran escala de los anticuerpos de transfecciones estables, los recogido de los cultivos celulares se aclaró mediante filtración terminal usando cápsulas de filtración Sartorius® (Sartorius® AG, Goettingen, Alemania). La recolección aclarada se concentró desde aproximadamente 10 l a 750 ml usando un casete Pellicon® 2(30,000 dalton MWCO) (Millipore® Corporation), después se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A en una columna rProtein A Sepharose FF (Amersham Biosciences™ Corporation) usando el sistema de tampón citrato descrito en lo que antecede. El eluato de la proteína A se concentró en un aparato de agitación celular Amicon® usando una membrana YM30 (Millipore® Corporation), después, la muestra se intercambió con tampón en citrato sódico 20 mM, NaCl 120 mM, pH 6,0, usando una columna Superdex™ 200 (Amersham Biosciences™ Corporation). Se midieron el pH y la osmolalidad y las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron mediante espectroscopia UV midiendo la absorbancia a 280 nm (1 mg/ml= 1,4 A₂₈₀).

SDS-PAGE:

Muestras de cinco μg de anticuerpos purificados se pasaron en condiciones reductoras i no reductoras en geles NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris (Invitrogen™) y se tiñeron usando el kit SimplyBlue™ SafeStain Kit (Invitrogen™) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Resultados:

- 5 Los mutantes de Fc IgG2M3 y Fc de IgG1 se expresaron como anticuerpos anti-HBV, que comprenden las regiones variables de la cadena ligera y pesada de OST577 (Ehrlich et al., op. cit.), la region constante de la cadena ligera del lambda-2 humano (Hieter et al. (1981), op. cit.), y las regiones constantes de la cadena pesada del mutante 3 de gamma.2 humano (IgG2M3) (Cole et al., op. cit.) e IgG1 (Ellison et al., op. cit.), respectivamente. La variante IgG2M3 contiene dos sustituciones de aminoácidos en la región C_H2 (V234A y G237A), y muestra una unión residual a los receptores de Fc γ humanos extremadamente baja (Cole et al., op. cit.). Los mutantes de Fc de IgG2M3 y de Fc de IgG1 también se expresaron en forma de anticuerpos anti-alelo de la cadena β del HLA-DR, que comprenden las regiones variables de la cadena ligera y pesada de Hu1D10 (Kostelny et al. (2001), op. cit.), la región constante de la cadena ligera del kappa humano (Hieter et al. (1980), op. cit.), y las regiones constantes de la cadena pesada del mutante IgG2M3 humano (IgG2M3) (Cole et al., op. cit.) e IgG1 (Ellison et al., op. cit.), respectivamente. Como se ha descrito en lo que antecede, el vector de expresión adecuado salvaje o de cadena pesada mutante se co-transfeccionó de forma transitoria con el vector de expresión adecuado de cadena ligera en células 293-H para la expresión de los anticuerpos monoclonales OST577 o Hu1D10. El análisis ELIS de los sobrenadantes de los cultivos recogidos 5-7 días después de la transfección transitoria mostró niveles de expresión de anticuerpos que normalmente eran de 5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en 25 ml del sobrenadante. Los anticuerpos de OST577 o Hu1D10 se purificaron mediante cromatografía de afinidad con proteína A para un rendimiento final de aproximadamente 100-1000 μg . La expresión estable de anticuerpos OST577 o Hu1D10 en células Sp2/0 típicamente dio como resultado niveles de expresión de 5-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ determinado mediante ELISA. Se obtuvieron rendimientos de aproximadamente 50-80% del anticuerpo presente en los sobrenadantes de los cultivos mediante cromatografía de afinidad con proteína A a pequeña escala.
- 25 Los anticuerpos purificados se caracterizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. El análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras indicó que los anticuerpos purificados tenían un peso molecular de aproximadamente 150-160 kD (datos no mostrados); el análisis en condiciones reductoras indicó que los anticuerpos purificados estaban compuestos por una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kD y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kD (véanse las Figuras 10A y 10B). El análisis SDS-PAGE de los anticuerpos purificados de transfectantes estable con Sp2/0 dio resultados similares a los observados con los anticuerpos purificados de transfecciones transitorias con 293-H.

Ejemplo 6

Este ejemplo describe el análisis de unión competitiva de los anticuerpo mutantes IgG2M3 e IgG1

35 Cultivo celular:

- La línea celular de mieloma de ratón NS0 (Colección europea de cultivos celulares animales, Salisbury, Wiltshire, UK) se mantuvo en DMEM con 10% de FBS. Los transfectantes NS0 que expresan FcRn recombinante, nido a GPI humano o de rhesus en la superficie se mantuvieron en medio de selección con ácido micofenólico (MPA) (DMEM, 10% FBS, 1X HT Media Supplement Hybri-MaX® (Sigma®), 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de xantina Sigma®), 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ácido micofenólico (Life Technologies®) y L-glutamina 2 mM o medio de selección x 2MPA.

Línea celular de FcRn humano:

- Las células NS0 se transfeccionaron de forma estable con pDLI208. Aproximadamente 1×10^5 células se lavaron una vez y se resuspendieron en 1 ml de MDEM normal, se transfirieron a un Gene Pulser™ Cuvette (Bio-Rad® Laboratories) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. 40 μg del plásmido pDL208 se linealizaron con FspI y se mezclaron suavemente con las células en hielo, después las células se sometieron a electroporación pulsando dos veces usando un Gene Pulser™ II (Bio-Rad® Laboratories) fijado a 1,5 kV, 3 μF y se devolvieron al hielo durante 10 minutos. Las células se diluyeron en 20 ml de DMEM, 10% de FBS, y se sembraron en dos placas de 96 pocillos a 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$. Tras 48 horas se reemplazó el medio por medio de selección MPA. Los transfectantes NS0 resistentes a ácido micofenólico de los pocillos que aparentemente contenían colonias sencillas se expandieron en medio de selección MPA y se seleccionaron tras aproximadamente 3 semanas mediante FACS™. Aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células/ensayo se incubaron en 100 μl de tampón de tinción para FACS (FSB) (PBS, 1% de FBS, 0,1 NaN_3) que contiene 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti- β 2-microglobulina anti-humano de ratón biotinilado (Chromaprobe, Inc., Aptos, CA) durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron una vez con 4 ml de FSB, después

se incubaron en 25 µl de FSB que contiene 20 µg/ml de conjugado estreptavidina-FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc.) durante 30 minutos en hielo en oscuridad. Las células se lavaron una vez con 4 ml de FSB y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo a β2m humana usando un citómetro de flujo FACScan (BD® Biosciences, San Jose, CA). Varios clones con la mayor tinción aparente se subclonaron usando un clasificador celular FACStar (BD® Biosciences), se expandieron en DMEM, 10% de FBS, L-glutamina 2 mM y se volvieron a analizar mediante el FACS™ tal como se ha descrito en lo que antecede. Un subclon, denominado NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3, se usó en los ensayos de unión posteriores.

Línea celular de FcRn de rhesus:

Las células NS0 se transfeccionaron de forma estable con pDL410. Aproximadamente 6×10^7 células se transfeccionaron mediante electroporación como se ha descrito en lo que antecede. Los transfectantes se identificaron mediante FACS™ tal como se ha descrito en lo que antecede con tinción con 100 ng/ensayo de un anticuerpo anti-cadena alfa de FcRn anti-humano de ratón (Protein Design Labs™, Inc.) que sufre reacción cruzada con la cadena alfa de FcRn de rhesus y se detecta con anticuerpo conjugado con FITC anti-kappa de ratón de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.). Una línea celular designada NS0 RhFcRn, clon R-3, se usó en los ensayos de unión posteriores.

Ensayo de unión competitiva de un solo punto:

Los sobrenadantes de OST577-IgG2M3 concentrados se analizaron en un ensayo de unión competitiva de un solo punto para la unión al FcRn humano en la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3. Aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en tampón de unión de FACS (FBB) (PBS que contiene 0,5% de FBS, 0,1 % de Na_3N), pH 8,0, una vez en FBB, Ph 6,0 y se resuspendieron en 120 µl de anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado pre-mezclado (8,3 µg/ml) y el sobrenadante se concentró (que contiene 8,3 µg/ml del anticuerpo competidor) en FBB, Ph 6,0. Las células se incubaron durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, Ph 6,0, y se resuspendieron en 25 µl de conjugado estreptavidina-RPE ((BioSource International) diluido a 2,5 µg/ml en FBB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, Ph 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACS™ usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences). La fluorescencia media en el canal (MCF) de cada mutante se comparó con la del anticuerpo salvaje y se representó con Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, WA).

Ensayos de unión competitiva:

Una serie de diluciones de cada anticuerpo OST577-IgG2M3 purificado se presentaron contra el anticuerpo HuEP5C7-IgG2M3 biotinilado (He et al., J. Immunol. 160:1029-1035 (1998)) para determinar la unión al FcRn en la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3. Para los experimentos de detección iniciales, aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FSB, pH 6,0, y se resuspendieron en 100 µl del anticuerpo HuEP5C7-IgG2M3 biotinilado premezclado (10 µg/ml) y el anticuerpo competidor OST577-IgG2M3 (diluciones en serie por dos de 208 µg/ml a 0,102 µg/ml) en FSB, pH 6,0. Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FSB, pH 6,0, y se resuspendieron en 25 µl de conjugado estreptavidina-RPE ((BioSource International) diluido a 2,5 µg/ml en FSB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FSB, pH 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACSTM usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences). La fluorescencia media en el canal (MCF) se representó contra la concentración del competidor y se calcularon los valores de CI50 usando GraphPad Prism® (GraphPad™ Software, Inc., San Diego, GA). Para la consistencia, los valores de CI50 que se muestran en las Tablas se basan en las concentraciones finales del competidor.

Los siguientes experimentos de unión competitiva se realizaron como se ha descrito en lo que antecede, excepto porque las células se lavaron una vez en FBB, pH 8,0, y una vez en FBB, pH 6,0, después se resuspendieron en 100 µl de anticuerpo HuEP5G7-IgG2M3 biotinilado pre-mezclado (10 100 µg/ml) y el anticuerpo competidor OST577-IgG2M3 (diluciones en serie por dos de 208 µg/ml a 0,102 µg/ml) en FBB, pH 6,0. Todas las incubaciones y lavados posteriores se realizaron usando FBB, Ph 6,0, como se ha descrito en lo que antecede. Un grupo de experimentos se realizó en 120 µl de anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado pre-mezclado (8,3 µg/ml) y el anticuerpo competidor OST577-IgG2M3 (diluciones en serie por dos de 208 µg/ml a 0,102 µg/ml) en FBB, pH 6,0, como se ha descrito en lo que antecede. Otro grupo de experimentos se realizó en 200 µl de anticuerpo OST577-IgG1 biotinilado pre-mezclado (5,0 µg/ml) y el anticuerpo competidor OST577-IgG1 (diluciones en serie por dos comenzando desde 125 µg/ml o diluciones en serie por tres comenzando desde 250 µg/ml) en FBB, pH 6,0, como

se ha descrito en lo que antecede. Un grupo más de experimentos se realizó en 200 µl de anticuerpo OST577-IgG1 biotinilado pre-mezclado (5,0 µg/ml del anticuerpo competidor OST577-IgG1 (diluciones en serie por tres comenzando desde 750 µg/ml) en FBB, pH 6,0, como se ha descrito en lo que antecede.

Una serie de diluciones de cada anticuerpo OST577-IgG2M3 purificado se presentaron contra el anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado para determinar la unión al FcRn de rhesus en la línea celular NS0 RhFcRn, clon R-3. En un grupo de experimentos, aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FBB, Ph 8,0, y una vez en FBB, Ph 6,0, después se resuspendieron en 120 µl de anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado pre-mezclado (8,3 µg/ml del anticuerpo competidor OST577-IgG2M3 (diluciones en serie por dos comenzando desde 208 µg/ml a 0,102 µg/ml) en FBB, pH 6,0. Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 25 µl de conjugado estreptavidina-RPE ((BioSource International) diluido a 2,5 µg/ml en FBB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, Ph 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACSTM usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences). Un grupo más de experimentos se realizó en 200 µl de anticuerpo OST577-IgG1 biotinilado pre-mezclado (5,0 µg/ml del anticuerpo competidor OST577-IgG1 (diluciones en serie por tres comenzando desde 500 µg/ml) en FBB, pH 6,0, como se ha descrito en lo que antecede

Resultados:

La unión relativa de los anticuerpos OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1 de tipo salvaje y sus diversos mutantes a CRN se determinó usando una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable FcRn humano en su superficie. Como se ha descrito en lo que antecede, los sobrenadantes concentrados se analizaron para determinar la unión a FcRn humano de acuerdo con un ensayo de unión competitiva de un solo punto y los anticuerpos purificados se analizaron para determinar la unión a FcRn en los ensayos de unión competitiva. Crecientes concentraciones de los anticuerpos competidores sin marcar se incubaron con células en presencia de una concentración subsaturante de anticuerpo IgG2M3 o IgG1 marcado en FSB o FBB, pH 6,0.

Los resultados de experimentos típicos con sobrenadantes concentrados de OST577-IgG2M3 se muestran en las figuras 11A, 11B, y 11C. Como se muestra en la figura 11A, algunos de los mutantes en la posición 250 (p. ej. T250E, T250Q) eran competidores más fuertes que los de tipo salvaje, lo que sugiere que estos mutantes tienen mayor unión al FcRn humano en comparación con el anticuerpo salvaje. Otros mutantes en esta posición (p. ej., T250D, T250F, T250K, T250N, T250P, T250R, T250W, T250Y) eran competidores más débiles que el salvaje, lo que sugiere que estos mutantes tienen menor unión al FcRn humano en comparación con el anticuerpo salvaje. Como se muestra en la Figura 11B, ninguno de los mutantes en la posición 314 fue un competidor más fuerte que el salvaje, lo que sugiere que ninguno de estos mutantes tiene mayor unión a FcRn comparación con el anticuerpo salvaje. La mayoría de los mutantes en esta posición (p. ej. L314A, L314G, L314D, L314E, L314F, L314G, L314H, L314K, L314M, L314N, L314P, L314Q, L314R, L314S, L314T, L314V, L314W, L314Y) eran competidores más débiles que el salvaje, lo que sugiere que estos mutantes tienen menor unión al FcRn humano en comparación con el anticuerpo salvaje. Como se muestra en la Figura 11C, algunos de los mutantes en la posición 428 (p. ej. M428F, M428L) fueron competidores más fuertes que el salvaje, lo que sugiere que estos mutantes tiene mayor unión a FcRn comparación con el anticuerpo salvaje. Otros mutantes en esta posición (p. ej., M428A, M428G, M428D, M428E, M428G, M428H, M428K, M428N, M428P, M428Q, M428R, M428S, M428T, M428V, M428Y) eran competidores más débiles que el salvaje, lo que sugiere que estos mutantes tienen menor unión al FcRn humano en comparación con el anticuerpo salvaje

La Tabla 2 resume los valores de CI50 (la cantidad de anticuerpo competidor necesaria para inhibir la unión del anticuerpo marcado al FcRn en un 50%) del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje purificado y algunos de sus mutantes para la unión al FcRn humano. Los valores de unión relativa se calcularon en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje y el de cada uno de los mutantes. En la posición de aminoácido 314, ninguno de los mutantes purificados mostró un incremento de la unión al FcRn humano respecto al anticuerpo salvaje. De hecho, los cuatro mutantes purificados en la posición 314 mostraron menor unión respecto al anticuerpo salvaje. No obstante, en la posición de aminoácido 250, uno de los mutantes (T250E) mostró una unión aproximadamente 3 veces mejor al FcRn que el anticuerpo salvaje, Varios mutantes en la posición 250 mostró una unión ligeramente menor respecto al anticuerpo salvaje y un mutante (T250D) mostró una unión sustancialmente reducida al FcRn humano respecto al anticuerpo salvaje. En la posición de aminoácido 428, uno de los mutantes (M428F) también mostró una unión aproximadamente 3 veces mejor al FcRn humano que el anticuerpo salvaje, mientras que otro mutante (M428G) mostró una unión sustancialmente reducida al FcRn humano respecto al anticuerpo salvaje.

Dado que se identificaron dos sustituciones de aminoácidos en dos posiciones distintas, a saber T250E, T250Q, M428F y M428L, cada uno con un incremento en la unión al FcRn humano, se construyeron los mutantes dobles

T250E/M428F, T250Q/M428F, y T250Q/M428L, se transfeccionaron de forma transitoria en células 293-H, se purificaron y se analizó la unión al FcRn humano. Como se ha descrito en lo que antecede, crecientes concentraciones de los anticuerpos competidores sin marcar se incubaron con células que expresan el FcRn en presencia de una concentración subsaturante de anticuerpo HuEP5C7-IgG2M3 o OST577-IgG2M3 marcado en FBB, pH 6,0.

Como se muestra en la Figura 12A, el mutante doble (T250E/M428F) mostró mejor unión al FcRn humano que cualquiera de los mutantes sencillos (T250E o M428F) y mostró una unión aproximadamente 15 veces mejor al FcRn humano que el anticuerpo salvaje. Como se muestra en la Figura 12B, el mutante doble (T250Q/M428L) mostró mejor unión al FcRn humano que cualquiera de los mutantes sencillos (T250Q o M428L) o el mutante doble (T250Q/M428F) y mostró una unión aproximadamente 28 veces mejor al FcRn humano que el anticuerpo salvaje. Como se resume en la Tabla 3, en un grupo de experimentos, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje es ~9 µg/ml, mientras que la CI50 para cada uno de los mutantes sencillos (T250E y M428F) es ~ 3 µg/ml y la CI50 para el mutante doble (T250E/M428F) es inferior a 1 µg/ml. Como se resume en la Tabla 4, en otro grupo de experimentos, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje es ~ 12 µg/ml, mientras que la CI50 para cada uno de los mutantes sencillos (T250Q and M428L) y para el mutante doble (T250Q/M428F) es ~ 2,4 µg/ml y la CI50 para el mutante doble (T250Q/M428L) es inferior a 1 µg/ml.

También se crearon el OST577-IgG1 salvaje, los mutantes sencillos T250E, T250Q, M428F, M428L y los mutantes dobles T250E/M428F y T250Q/M428L. Como se resume en la Tabla 5, en un grupo de experimentos, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG1 salvaje es ~14 µg/ml, mientras que la CI50 para cada uno de los mutantes sencillos (T250E y M428F) es ~ 3-5 µg/ml y la CI50 para el mutante doble (T250E/M428F) es inferior a 1 µg/ml. Como se resume en la Tabla 6, en otro grupo de experimentos, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG1 salvaje es ~ 10 µg/ml, mientras que la CI50 para el mutante sencillo (T250Q) es ~ 3 µg/ml y la CI50 para el mutante sencillo (M428L) y el mutante doble (T250Q/M428L) es inferior a 1 µg/ml.

La unión de OST577-IgG2M3 y algunos de sus mutantes al FcRn de rhesus se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 7, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje es ~ 15 µg/ml, mientras que la CI50 para cada uno de los mutantes sencillos (T250Q y M428L) y para el mutante doble (T250Q/M428F) es ~ 2-4 µg/ml, y la CI50 para el mutante doble T250Q/M428L es inferior a ~ 1 µg/ml. La unión de OST577-IgG1 y algunos de sus mutantes al FcRn de rhesus también se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 8, la CI50 para el anticuerpo OST577-IgG1 es ~ 9µg/ml, mientras que la CI para el mutante sencillo (T250Q) es ~ 3 µg/ml y la CI50 para el mutante sencillo (M428L) y para el mutante doble (T250Q/M428L) es inferior a 1 µg/ml.

TABLA 2

Nombre ^a (IgG2M3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	6	10,7 ± 4,6	1,0
L314W	2	20,2 ± 2,0	0,53
L314Q	2	32,0 ± 2,3	0,33
L314A	2	68,7 ± 2,1	0,16
L314R	2	102 ± 4	0,11
T250E	1	3,82	2,8
T250S	2	12,0 ± 0,9	0,89
T250A	2	13,3 ± 0,5	0,80
T250V	3	19,0 ± 1,8	0,56
T250D	1	>210	<0,050
M428F	2	3,40 ± 0,53	3,1
M428G	1	147	0,072

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 (± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al HuEP5C7-IgG2M3 biotinilado en FSB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 3

Nombre ^a (IgG2M3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	9,40 ± 2,87	1,0
T250E	3	2,71 ± 1,16	3,5
M428F	3	2,97 ± 0,30	3,2
T250E/M428F	2	0,639 ± 0,094	15

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al HuEP5C7-IgG2M3 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 4

Nombre ^a (IgG2M3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	11.9 ± 2.5	1.0
T250Q	3	4.20 ± 1.02	2.8
M428L	3	1.79 ± 0.69	6.7
T250Q/M428F	3	1.50 ± 0.31	8.0
T250Q/M428L	3	0.430 ± 0.084	28

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al OST577-IgG2M3 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

5

TABLA 5

Nombre ^a (IgG1)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	6	13,9 ± 4,2	1,0
T250E	3	5,26 ± 0,87	2,6
M428F	5	3,44 ± 1,22	4,0
T250E/M428F	4	0,990 ± 0,786	14

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al OST577-IgG1 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG1 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 6

Nombre ^a (IgG1)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	5	10,3 ± 2,8	1,0
T250Q	5	3,14 ± 0,86	3,3
M428L	5	0,896 ± 0,304	11
T250Q/M428L	5	0,351 ± 0,144	29

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al OST577-IgG1 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG1 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 7

Nombre ^a (IgG2M3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	14,8 ± 2,7	1,0
T250Q	3	4,05 ± 0,24	3,6
M428L	3	1,92 ± 0,46	7,7
1750Q/M428F	3	1,77 ± 0,60	8,4
T250Q/M428L	3	0,554 ± 0,052	27

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al OST577-IgG2M3 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn rhesus se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG2M3 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

5

TABLA 8

Nombre ^a (IgG1)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	8,86 ± 0,52	1,0
T250Q	3	2,97 ± 0,59	3,0
M428L	3	0,629 ± 0,060	14
T250Q/M428L	3	0,236 ± 0,013	37

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente al OST577-IgG1 biotinilado en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 6.

^dLa unión relativa al FcRn de rhesus se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG1 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la confirmación de las propiedades de los mutantes IgG2M3 e IgG1 en la unión a FcRn

Ensayo de unión directa:

10 Los anticuerpos OST577-IgG2M3 purificados se analizaron para determinar la unión al FcRn humano en la línea

celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3, o a células NS0 no transfeccionadas en FBB a pH 6,0. Aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FBB, pH 8,0, y una vez en FBB, pH 6,0, después se resuspendieron en 100 μ l de anticuerpo a una concentración de 11 μ g/ml en FBB, a pH 6,0. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 25 μ l de anticuerpo conjugado con RPE de IgG antihumana de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluido a 5 μ g/ml en FBB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACSTM usando un citómetro de flujo FACScan (BD® Biosciences). La fluorescencia media en el canal (MCF) se representó usando Excel (Microsoft® Corporation).

Ensayo de unión competitiva a 37° C

Una serie de diluciones de cada anticuerpo OST577-IgG2M3 purificado se presentaron contra el anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado para determinar la unión al FcRn humano en la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3. Aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FBB, pH 8,0, y una vez en FBB, pH 6,0, después se resuspendieron en 100 μ l de anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado pre-mezclado (10 μ g/ml del anticuerpo competidor OST577-IgG2M3 (diluciones en serie por dos comenzando desde 208 μ g/ml a 0,102 μ g/ml) en FBB, pH 6,0. Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 1 hora a 37°C, se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 25 μ l de conjugado estreptavidina-RPE ((BioSource International) diluido a 2,5 μ g/ml en FBB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACSTM usando un citómetro de flujo FACScan (BD® Biosciences). La fluorescencia media en el canal (MCF) se representó contra la concentración del competidor y se calcularon los valores de CI50 usando GraphPad Prism® (GraphPadTM Software).

Ensayo de liberación y unión dependiente de pH:

Los anticuerpos OST577-IgG2M3 and OST577-IgG1 mutantes purificados se compararon con los respectivos anticuerpos de tipo salvaje según la unión a FcRn humano y, después, se liberaron a varios valores de pH en ensayos de liberación y de unión de un solo punto usando la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3. Aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FBB, pH 8,0, y una vez en FBB, pH 6,0, después se resuspendieron en 100 μ l de anticuerpo purificado (10 μ g/ml) en FBB, pH 6,0. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, u 8,0, y se resuspendieron en 25 μ l de anticuerpo conjugado con FITC de IgG antihumana de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluido a 1,25 en FBB al pH adecuado. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB al pH adecuado, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACSTM usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences). La fluorescencia media en el canal (MCF) se representó usando Excel (Microsoft® Corporation).

Los anticuerpos OST577-IgG2M3 and OST577-IgG1 mutantes purificados se compararon con los respectivos anticuerpos de tipo salvaje según la unión a FcRn de rhesus y, después, se liberaron a varios valores de pH en ensayos de liberación y de unión de un solo punto usando la línea celular NS0 RhFcRn, clon R-3, como se ha descrito en lo que antecede

Resultados:

Las propiedades de unión de los anticuerpos OST577-IgG2M3 o OST577-IgG1 de tipo salvaje y sus diversos mutantes a FcRn humano se confirmó usando una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable FcRn humano en su superficie. Para confirmar que la unión de los anticuerpos mutantes era específica del FcRn humano sobre la línea celular NS0 transfeccionada, en lugar de producirse a través de algún otro receptor o por un mecanismo desconocido, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a célula NS0 no transfeccionadas frente a una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable del FcRn. Como se ha descrito en lo que antecede, las células se incubaron con una concentración subsaturante del anticuerpo en FBB, pH 6,0, y la unión se analizó mediante FACSTM. Como se muestra en la Figura 13, los resultados indicaron que no había unión aparente con la línea celular NS0 parental, lo que sugiere que los anticuerpos se unen específicamente a las células transfeccionadas mediante un FcRn humano.

Para confirmar que cada uno de los mutantes generados en la presente invención se han comportado de una forma fisiológicamente relevante se investigaron más estrechamente los efectos de la temperatura y el pH sobre la unión al FcRn humano. Dado que los ensayos de unión competitiva iniciales se realizaron a 4°C, los experimentos se

repetieron a la temperatura más fisiológicamente relevantes de 37°C para mostrar que los mutantes todavía eran activos a esta temperatura. Como se ha descrito en lo que antecede, crecientes concentraciones de los anticuerpos competidores sin marcar se incubaron con células que expresan el FcRn humano en presencia de una concentración subsaturante de anticuerpo OST577-IgG2M3 marcado a 37°C en FBB, pH 6,0. Como se muestra en la figura 14, los resultados indicaron que los anticuerpos mantenían su patrón relativo de unión a FcRn humano a 37°C.

Se sabe que la unión de IgG a FcRn depende del pH. La IgG se une fuertemente al FcRn a pH 6,0, pero débilmente a pH 8,0. Con el fin de someter a ingeniería a los anticuerpos mutantes con mayores semividas en suero, es deseable incrementar la unión a FcRn a pH 6,0, manteniendo la liberación dependiente de pH de FcRn a pH 8,0. Para confirmar que la unión dependía del pH, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable el FcRn humano y, después, se libera a valores de pH variables desde pH 6,0 a pH 8,0. Como se ha descrito en lo que antecede, las células se incubaron con una concentración subsaturante del anticuerpo en FBB, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, o 8,0, y la unión se analizó mediante FACSTM. Como se muestra en la Figura 15A, los resultados indicaron que los anticuerpos OST577-IgG2M3 modificados que tienen las mutaciones T250E, T250Q, M428F, M428L, T250E/M428F, T250Q/M428F, o T250Q/M428L mostraron todos una unión fuerte al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Como se muestra en la Figura 15B, los resultados indicaron que los anticuerpos OST577-IgG1 modificados que tienen las mutaciones T250E, M428F, o T250E/M428F mostraron todos una unión fuerte al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. El anticuerpo OST577-IgG1 que tiene la mutación T250D mostró una unión más débil (en comparación con el salvaje) al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Como se muestra en la Figura 15C, los resultados indicaron que los anticuerpos OST577-IgG1 modificados que tienen las mutaciones T250Q, M428L, o T250Q/M428L mostraron todos una unión fuerte al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Estos resultados indicaron que la unión de los anticuerpos al FcRn humano era, de hecho, dependiente del pH.

De forma similar, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable FcRn de rhesus y, después, se libera a valores de pH que varían desde pH 6,0 a pH 8,0. Como se muestra en la Figura 15D, los resultados indicaron que los anticuerpos OST577-IgG2M3 modificados que tienen las mutaciones T250E, T250Q, M428F, M428L, T250E/M428F, T250Q/M428F, o T250Q/M428L mostraron todos una unión fuerte al FcRn de rhesus a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Como se muestra en la Figura 15E, los resultados indicaron que los anticuerpos OST577-IgG1 modificados que tienen las mutaciones T250Q, M428L, o T250Q/M428L mostraron todos una unión fuerte al FcRn de rhesus a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Estos resultados indicaron que la unión de los anticuerpos al FcRn de rhesus era, también, dependiente del pH.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe confirmación de propiedades adicionales de los mutantes IgG2M3 e IgG1.

Cultivo celular:

La línea celular Raji de linfoma de Burkitt humano (Colección Americana de Cultivos Tipo) se mantuvo en medio RPMI 1640 con L-glutamina (BioWhittakerTM) que contiene 10% de FBS (HyClone[®]) y 1% de penicilina-estreptomomicina (Life Technologies[®]).

Ensayos de unión a antígeno:

La actividad de unión al antígeno de los anticuerpos OST577 mutantes y salvaje se confirmó mediante un ELISA de unión competitiva. 2 placas ImmulonTM (DYNEX[®] Technologies) se revistieron durante la noche a 4°C con 1,0 µg/ml de anticuerpo recombinante del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) (Advanced ImmunoChemical, Inc., Long Beach, CA). Al día siguiente, las placas se lavaron con EWB y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo SuperBlok[®] en TBS (Pierce Chemical Company) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con EWB y a cada pocillo se añadieron anticuerpo OST577-IgG2M3 biotinilado premezclado (0,25 µg/ml) y el anticuerpo OST577-IgG2M3 competidor (diluciones en serie por dos de 33 µg/ml a 0,033 µg/ml) o el anticuerpo OST577-IgG1 biotinilado premezclado (0,25 µg/ml) y el anticuerpo OST577-IgG1 competidor (diluciones en serie por dos de 67 µg/ml a 0,067 µg/ml) en 100 µl de EB. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, después se lavaron con EWB y se añadieron 100 µl/pocillo de conjugado estreptavidina-HRP (Pierce Chemical Company) a 1 µg/ml en EB. Tras incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, las placas se lavaron con EWB, seguido por la adición de 100 µl/pocillo de ABTS sustrato peroxidasa/solución B de peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se detuvo con 100 µl/pocillo de 2% de ácido oxálico y se midió la

absorbancia a 415 nm usando un lector de placas de microtitulación VERSAmax™ (Molecular Devices Corporation™).

La actividad de unión al antígeno de los anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 salvaje y mutantes se confirmó en un ensayo de unión en FACS™ usando células Raji, que expresan un alelo de la cadena β de HLA-DR que es reconocida por Hu1D10 (Kostelny y col. (2001), op. cit.). Aproximadamente 2.5×10^5 células/ensayo se lavaron una vez con FBB, pH 7,4, y se resuspendieron en 140 μ l del anticuerpo Hu1D10-IgG2M3 (diluciones en serie por tres de 60 μ g/ml a 0,027 μ g/ml) en FBB, pH 7,4. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 7,4, y se resuspendieron en 25 μ l del anticuerpo conjugado con RPE de F(ab')₂ kappa antihumano de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluido hasta 10 μ g/ml en FBB, pH 7,4. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, Ph 704, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al alelo de la cadena β de HLA-DR mediante FACS™ usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences).

De forma similar, la actividad de unión al antígeno de los anticuerpos Hu1D10-IgG1 salvaje y mutantes se confirmó mediante ensayo de unión en FACS™ usando células Raji. Aproximadamente $2,0 \times 10^5$ células/ensayo se lavaron una vez con FBB, pH 7,4, y se resuspendieron en 100 μ l del anticuerpo Hu1D10-IgG1 (diluciones en serie por dos de 25 μ g/ml a 12,5 μ g/ml, después diluciones en serie por tres de 12,5 μ g/ml a 0,0020 μ g/ml) en FBB, pH 7,4. Una dilución en serie del anticuerpo HuFd79-IgG1 (Co et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2869-2873 (1991)) se preparó como se ha descrito en lo que antecede y se usó como control negativo. Las células se incubaron con el anticuerpo durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 7,4, y se resuspendieron en 25 μ l del anticuerpo conjugado con FITC anti F(ab')₂ de IgG humana de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluido hasta 20 μ g/ml en FBB, pH 7,4. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, pH 7,4, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al alelo de la cadena β de HLA-DR mediante FACS™ usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences).

Ensayo de ADCC:

La actividad de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos Hu1D10 salvaje y mutantes se confirmó midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como efectores y células Rajo como dianas siguiendo un procedimiento publicado (Shields et al., op. cit.). Las PBMC se prepararon a partir de sangre entera usando un gradiente de Ficoll-Paque® Plus (Amersham Biosciences™ Corporation) y se resuspendieron en una densidad de 8×10^6 células/ml en medio de ensayo (RPMI1640, 1% BSA). Las células Raji se lavaron tres veces en medio de ensayo y se resuspendieron a una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/ml en medio de ensayo. Los anticuerpos Hu1D10 salvaje y mutantes se diluyeron hasta 4 μ g/ml, 0,25 μ g/ml y 0,016 μ g/ml en medio de ensayo. Las células Raji (50 μ l/pocillo) y el anticuerpo Hu1D10 (50 μ l/pocillo), es decir 200 ng/ensayo, 12,5 ng/ensayo o 0,8 ng/ensayo se combinaron en los pocillos de una placa de ensayo de fondo en U de 96 pocillos de tipo Falcon BD® Biosciences) y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las PBMC (100 μ l/pocillo, es decir 40:1 proporción efectoras/diana) se añadieron a las células opsonizadas y se incubaron durante 4 horas a 37°C en un incubador con CO₂. La citotoxicidad mediada por células independiente de anticuerpos (AICC) se midió incubando células efectoras y diana en ausencia de anticuerpo. La liberación espontánea se midió incubando las células diana (SR_{diana}) o las células efectoras (SR_{efectoras}) en ausencia de anticuerpo. La liberación máxima (MR) se midió añadiendo 2% de Tritón X-100 a las células diana. Las placas se centrifugaron suavemente y los sobrenadantes (100 μ l/pocillo) se transfirieron a una placa de fondo plano de 96 pocillos de tipo Falcon. La actividad LDH se midió incubando los sobrenadantes con 100 μ l/pocillo de la mezcla de reacción de LDH del kit de detección Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics Corporation) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con 50 μ l/pocillo de HCl 1N y se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas de microtitulación VERSAmax™ (Molecular Devices Corporation®). El porcentaje de citotoxicidad se calculó como $(\text{liberación LDH}_{\text{muestra}} - \text{SR}_{\text{efectora}} - \text{SR}_{\text{diana}}) / (\text{MR}_{\text{diana}} - \text{SR}_{\text{diana}}) \times 100$.

Resultados:

Las propiedades de unión a antígeno de los anticuerpos OST577 and Hu1D10 salvaje y mutantes a sus respectivos antígenos se confirmó usando los ensayos de unión adecuados. Como se ha descrito en lo que antecede, la unión de los anticuerpos OST577 a HBsAg se determinó en un ELISA competitivo. Como se muestra en la Figura 16A, la unión de los anticuerpos OST577-IgG2M3 salvaje y mutantes a HBsAg fue esencialmente idéntica. De forma similar, como se muestra en la Figura 16B, la unión de los anticuerpos OST577-IgG1 salvaje y mutantes a HBsAg fue esencialmente idéntica.

Como se ha descrito en lo que antecede, la unión de los anticuerpos Hu1D10 a una cadena β de HLA-DR se determinó en un ensayo de unión FACS. Como se muestra en la Figura 17A, la unión de los anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 salvaje y mutantes al alelo de la cadena β de HLA-DR fue esencialmente idéntica. De forma similar, como se muestra en la Figura 17B, la unión de los anticuerpos Hu1D10-IgG1 salvaje y mutantes al alelo de la cadena β de HLA-DR fue esencialmente idéntica. Estos resultados indican que, como cabría esperar, las mutaciones descritas en las posiciones 250 y 428 no afectan a la unión al antígeno.

La actividad ADCC de los anticuerpos Hu1D10 salvaje y mutantes se confirmó en un ensayo de liberación de LDH usando PBMC como efectores y células Raji como dianas. Como se muestra en la Figura 18A, usando un donante portador de los alelos homocigotos V/V de Fc γ III, la actividad ADCC del mutante doble (T250Q/M428L) del anticuerpo Hu1 D10-IgG1 fue muy similar a la del anticuerpo salvaje, mientras que la actividad ADCC del mutante sencillo (M428L) del anticuerpo Hu1D10-IgG1 disminuyó ligeramente en comparación con el anticuerpo salvaje. Como cabría esperar, los anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 salvaje y mutantes carecían de actividad ADCC. De forma similar, como se muestra en la Figura 18B, usando un donante portador de los alelos homocigotos F/F de Fc γ III, la actividad ADCC del mutante doble (T250Q/M428L) del anticuerpo Hu1 D10-IgG1 fue muy similar a la del anticuerpo salvaje, mientras que la actividad ADCC del mutante sencillo (M428L) del anticuerpo Hu1D10-IgG1 disminuyó algo en comparación con el anticuerpo salvaje. Los anticuerpos Hu1D10-IgG2M3 salvaje y mutantes carecían de actividad ADCC. Estos resultados indican que la mutación T250Q/M428L descrita en la presente invención no afecta a la actividad ADCC de la forma IgG1 del anticuerpo, mientras que la mutación M428L reduce ligeramente la actividad ADCC de la forma IgG1. Las mutaciones descritas en las posiciones 250 y 428 no afectan a la actividad ADCC de la forma IgG2M3 del anticuerpo.

Ejemplo 9

Este ejemplo describe los ensayos *in vitro* e *in vivo* de la semivida en suero.

Cabe esperar que los anticuerpos IgG humanos con mayor (o menor) afinidad por FcRn *in vitro* tengan una semivida en suero más prolongada (o más corta) *in vivo*, respectivamente. La afinidad de los mutantes de IgG humana por FcRn puede medirse *in vitro* mediante varios procedimientos, tales como resonancia de plasmón superficial (SPR) usando FcRn soluble conjugado con un chip biosensor adecuado o realizaron un experimento de unión competitiva usando FcRn expresado sobre la superficie de las células transfeccionadas. El FcRn usado en los experimentos de afinidad *in vitro* puede ser de origen murino, de rhesus o humano. La semivida en suero de mutantes de IgG humana con las propiedades deseadas puede medirse *in vivo* mediante la inyección en animales experimentales adecuados (p. ej., ratones o monos) o seres humanos de una dosis de anticuerpo en el intervalo de 0,1-10 mg de anticuerpo por kg de peso corporal, después, extrayendo muestras de suero a varios intervalos de tiempo para abarcar la semivida en suero prevista del anticuerpo y analizando las muestras para determinar la presencia de IgG intacta mediante una técnica adecuada tal como un ELISA.

Estudio de farmacocinética en rhesus:

En el California National Primate Research Center (CNPRC) at the University of California, Davis se realizó un estudio de farmacocinética no GLP titulado "Comparación Farmacocinética de tres variantes de OST577". Doce macacos rhesus macho se aleatorizaron por peso y fueron asignados a uno de tres grupos de estudio. Los cuatro animales que comprenden cada grupo de estudio recibieron, cada uno, una dosis intravenosa de OST577 salvaje o de una de las dos variantes a 1 mg/kg administrados durante quince minutos. Los anticuerpos OST577 fueron OST577-IgG2M3 salvaje, una variante de OST577-IgG2M3 que contiene la mutación sencilla M428L y una variante de OST577-IgG2M3 que contiene la mutación doble T250Q/M428L. Los tres anticuerpos se expresaron mediante transfección de las células Sp2/0 y se purificaron tal como se describe en el Ejemplo 5.

Se extrajeron muestras de sangre antes de la dosis el día 0 y a 1 y 4 horas después de la dosis, y a los , 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días. En cada punto de tiempo se extrajeron 4 ml de sangre de la vena safena, se preparó el suero y 2 alícuotas se congelaron y mantuvieron a -20°C hasta su uso. Para las determinaciones de química y hematología en suero se extrajeron muestras de sangre 16 días antes del estudio, antes de la dosis el día 0 y al final del estudio el día 56.

ELISA:

Las concentraciones de los anticuerpos OST577-IgG2M3 en muestras de suero de rhesus se determinaron mediante ELISA usando un ensayo cualificado. El suero de rhesus normal combinado (PNRS) se obtuvo del CNPRC. El mismo lote de PNRS se usó para preparar los calibradores, controles de suero positivos y para pre-dilución de muestras de suero de rhesus. Los calibradores se prepararon mediante dilución estándar de OST577-IgG2M3 en PNRS a 3000, 1500, 750, 375, 187,5, 93,75, 46,88, 23,44, y 0 ng/ml, se equilibraron durante 2 horas a

temperatura ambiente y se congelaron en alícuotas a -20°C. Los controles de suero positivos se prepararon contaminando los PNRS con OST577-IgG2M3 a 0,2 µg/ml para el control de suero positivo bajo, 0,4 µg/ml para el control de suero positivo medio y 0,8 µg/ml para el control de suero positivo alto, se equilibraron durante 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron en alícuotas a -20°C. Las muestras de suero pre-dosis para cada animal se usaron como controles negativos.

2 placas Immulon™ (DYNEX® Technologies, Inc.) se revistieron durante la noche a 2-8°C con 100 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal de idiotipo anti-OST577-IgG1 de ratón (OST577-γ1) anti-id, , Protein Design Labs™, Inc.) a 1,0 µg/ml en PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBST/Tween (solución salina tamponada con fosfato, 0,1% de Tween 20), se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS (Pierce Chemical Company) durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Los calibradores, controles de suero positivos y negativos, y las muestras de suero se descongelaron y llevaron hasta la temperatura ambiente antes de usar. Los calibradores, controles de suero positivos y negativos, y las muestras de suero se diluyeron a 1: 10 en de tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS. Las muestras de suero se pre-diluyeron de forma adecuada (1:10 a 1:80) en PNRS, después se diluyeron a 1:10 en tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. Los calibradores diluidos, controles séricos positivos y negativos, y las muestras de suero se añadieron a 100 µl/pocillo en pocillos por duplicado y se incubaron durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. El anticuerpo conjugado con HRP anti-cadena ligera de lambda humano de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) se preparó mediante dilución de 1:1000 en PBSBSA/Tween (solución salina tamponada con fosfato, 0,5% de seroalbúmina bovina, 0,1% de Tween 20), se añadieron a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. Se añadió ABTS Peroxidasa Sustrato/Peroxidasa Solución B (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 7 ± 1 minuto. El desarrollo se detuvo mediante la adición de solución de detención de sustrato (2% de ácido oxálico) a 100 µl/pocillo. La absorbancia a 415 nm se midió en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de detención de sustrato usando un lector de placa de microtitulación VERSAmax™ (Molecular Devices Corporation®).

Se preparó una curva de calibración usando los valores medios de la absorbancia obtenidos de los calibradores y el ajuste de los datos a una curva de regresión logística de cuatro parámetros usando SOFTmax® PRO, versión 4.0 (Molecular Devices Corporation®). El valor de la absorbancia media para el control de suero negativo (es decir, media de la muestra pre-dosis para cada animal) se restó de cada valor de la absorbancia obtenido para los calibradores. Las concentraciones del control de suero positivo se determinaron después de restar el valor medio de la absorbancia obtenido para el control de suero negativo a partir de cada valor de la absorbancia obtenido para los controles de suero positivos. Las concentraciones correspondientes a los valores medios de la absorbancia resultantes se obtuvieron mediante interpolación a partir de la curva de calibración. Las concentraciones de las muestras de suero se determinaron restando el valor medio de la absorbancia del control de suero negativo del valor de la absorbancia de cada muestra, realizando el promedio de los valores de la absorbancia resultantes, derivando la concentración correspondientes a los valores medios de la absorbancia mediante interpolación a partir de la curva de calibración y multiplicando la concentración resultante por el factor de pre-dilución, si existe, para llegar a la concentración final de cada muestra.

El intervalo cuantitativo estimado del ensayo fue de 0,10-0,90 µg/ml. El ensayo se consideró adecuado cuando se cumplieron las dos condiciones siguientes: (1) la concentración retrocalculada media de los tres calibradores en el intervalo cuantitativo estaba dentro del 20% de su valor nominal; y (2) los resultados medios calculados de cuatro de seis controles de suero positivos estaban dentro del 30% de su valor nominal, y al menos un resultado medio de cada nivel de concentración estaba dentro del 30% de su valor nominal. Los datos de las placas que no cumplían los criterios anteriores se rechazaron. Los datos de las muestras de suero individuales se rechazaron cuando se cumplió cualquiera de las siguientes tres condiciones: (1) los valores de absorbancia en los pocillos por duplicado diferían entre sí en más del 40%; (2) la concentración media calculada estaba por debajo del límite inferior de cualificación (LLOQ) del ensayo (0,10 µg/ml); (3) la concentración media calculada estaba por encima del límite superior de cualificación (ULOQ) del ensayo (0,90 µg/ml).

Resultados:

Los datos de la concentración del anticuerpo en suero se ajustaron con un modelo de dos compartimentos usando WinNonlin® Enterprise Edition, versión 3.2 (Pharsight® Corporation, Mountain View, CA). El modelo supone una distribución de primer orden y una tasa de eliminación de primer orden y ajusta bien los datos. Los datos del modelo (simulados sobre la base de cada media geométrica de cada grupo de los parámetros farmacocinéticos primarios),

así como la concentración ($\mu\text{g/ml}$) media de los anticuerpos en suero observada y la desviación estándar para cada grupo de cuatro animales se representaron como una función del tiempo (días después de la infusión) usando GraphPad Prism®, versión 3.02 (GraphPad™ Software, Inc.). Como se muestra en la figura 19, los datos indican que las concentraciones medias de anticuerpo en suero de las variantes M428L y T250Q/M428L de OST577-IgG2M3 se mantuvieron a niveles mayores que con OST577-IgG2M3 salvaje en todos los puntos de tiempo.

Se calcularon varios parámetros farmacocinéticos a partir de los datos usando WinNonlin® Enterprise Edition, versión 3.2 (Pharsight® Corporation). El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos se calculó usando GraphPad Prism®, versión 3.02 (GraphPad™ Software, Inc.) Como se muestra en la Tabla 9, la concentración media máxima en suero del anticuerpo ($C_{\text{máx}}$) fue muy similar entre los tres grupos de ensayo, lo que indica que los anticuerpos administrados estaban distribuidos en la circulación de un modo similar. Por tanto, las concentraciones mayores de anticuerpo de los anticuerpos mutantes de IgG2M3 siguiendo la fase de distribución son atribuibles a su mayor persistencia en el suero. El análisis del aclaramiento medio (CL) indicó que éste era el caso. El VI medio, el volumen de anticuerpo en suero eliminado por unidad de tiempo fue aproximadamente 1,8 veces menor para la variante M428L ($0,0811 \pm 0,0384 \text{ ml/h/kg}$; $p = 0,057$), y aproximadamente 2,8-veces menor para la variante T250Q/M428L ($0,0514 \pm 0,0075 \text{ ml/h/kg}$; $p = 0,029$) en comparación con el OST577-IgG2M3 salvaje ($0,144 \pm 0,047 \text{ ml/h/kg}$) (Tabla 9), lo que indica una disminución significativa del aclaramiento de OST577-IgG2M3 M428L y las variantes T250Q/M428L de la circulación de monos rhesus en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje.

Los perfiles FC de las variantes de OST577-IgG2M3 se analizaron adicionalmente calculando otros parámetros (Tabla 9) Dado que la AUC (área bajo la curva) es inversamente proporcional al CL, se deduce que la AUC media, el área bajo la curva concentración-tiempo extrapolada desde el tiempo cero hasta infinito fue aproximadamente 2 veces mayor que la variante M428L ($15,200 \pm 8.700 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/ml}$; $p=0,057$) y aproximadamente 2,6 veces mayor para la variante T250Q/M428L ($19,800 \pm 2,900 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/ml}$; $p = 0,029$) en comparación con OST577-IgG2M3 salvaje ($7,710 \pm 3,110 \text{ hr} \cdot \mu\text{g/ml}$) (Tabla 9), lo que indica un incremento significativo de la exposición total de las variantes M428L y T250Q/M428L de OST577-IgG2M3 en comparación con el anticuerpo salvaje.

Por último, la semivida media de eliminación (β -fase) fue aproximadamente 1,8 veces mayor para la variante M428L ($642 \pm 205 \text{ h}$), y aproximadamente 1.9 veces mayor para la variante T250Q/M428L ($652 \pm 28 \text{ hr}$, $p = 0.029$) en comparación con OST577-IgG2M3 salvaje ($351 \pm 121 \text{ hr}$) (Tabla 9). La semivida de eliminación para OST577-IgG2M3 salvaje en este estudio es similar a la de OST577-IgG 1 ($324 \pm 85 \text{ h}$) en un estudio FC previo con monos rhesus (Ehrlich et al., op. cit.).

TABLA 9

Nombre ^a (IgG2M3)	$C_{\text{máx}}^b$ ($\mu\text{g/ml}$)	CL ^c (ml/h/kg)	AUC ^d ($\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$)	Semivida de eliminación ^e (h)
Salvaje	$36,7 \pm 12,8$	$0,144 \pm 0,047$	7710 ± 3110	351 ± 121
M428L	$36,5 \pm 20,1$	$0,0811^* \pm 0,0384$	$15200^* \pm 8700$	642 ± 205
T250Q/M428L	$39,9 \pm 6,8$	$0,0514^* \pm 0,0075$	$19800^* \pm 2900$	$652^* \pm 28$

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^b Los valores de $C_{\text{máx}}$ ($\pm$ S.D.) se expresan y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 9.

^c Los valores de CL ($\pm$ S.D.) se expresan en ml/h/kg y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 9.

^d Los valores de AUC ($\pm$ S.D.) se expresan en $\text{h} \cdot \mu\text{g/ml}$ y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 9.

^e Los valores de la semivida de eliminación (SD) se expresan en h y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 9.

*Indica una diferencia significativa ($p < 0.060$) entre el grupo salvaje y cada grupo mutante. Se realizaron pruebas de Mann-Whitney usando GraphPad Prism como se ha descrito en el Ejemplo 9.

Ejemplo 10

Este ejemplo describe la aplicación de los ensayos de semivida en suero in Vitro e n vivo descritos en el Ejemplo 9 a los mutantes de los anticuerpos IgG1

Estudio de farmacocinética en rhesus:

- 5 En el California National Primate Research Center (CNPRC) at the University of California, Davis se realizó un estudio de farmacocinética no GLP titulado "Comparación Farmacocinética de tres variantes de OST577". Doce macacos rhesus macho se aleatorizaron por peso y fueron asignados a uno de tres grupos de estudio. Los cuatro animales que comprenden cada grupo de estudio recibieron, cada uno, una dosis intravenosa de OST577 salvaje o
- 10 OST577-IgG2M3 salvaje, una variante de OST577-IgG2M3 que contiene la mutación sencilla M428L y una variante de OST577-IgG2M3 que contiene la mutación doble T250Q/M428L. Los tres anticuerpos se expresaron mediante transfección de las células Sp2/0 y se purificaron tal como se describe en el Ejemplo 5.

- Se extrajeron muestras de sangre antes de la dosis el día 0 y a 1 y 4 horas después de la dosis, y a los , 7, 14, 21, 28, 42 y 56 días. En cada punto de tiempo se extrajeron 4 ml de sangre de la vena safena, se preparó el suero y 2
- 15 alícuotas se congelaron y mantuvieron a -20°C hasta su uso. Para las determinaciones de química y hematología en suero se extrajeron muestras de sangre antes de la dosis el día 0 y al final del estudio el día 56:

ELISA:

- Las concentraciones de los anticuerpos OST577-IgG1 en muestras de suero de rhesus se determinaron mediante ELISA usando un ensayo cualificado. El suero de rhesus normal combinado (PNRS) se obtuvo del CNPRC. El
- 20 mismo lote de PNRS se usó para preparar los calibradores, controles de suero positivos y para pre-dilución de muestras de suero de rhesus. Los calibradores se prepararon mediante dilución estándar de OST577-IgG1 en PNRS a 3000, 1500, 750, 375, 187,5, 93,75, 46,88, 23,44, y 0 ng/ml, se equilibraron durante 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron en alícuotas a -20°C. Los controles de suero positivos se prepararon contaminando los
- 25 PNRS con OST577-IgG1 a 0,2 µg/ml para el control de suero positivo bajo, 0,4 µg/ml para el control de suero positivo medio y 0,8 µg/ml para el control de suero positivo alto, se equilibraron durante 2 horas a temperatura ambiente y se congelaron en alícuotas a -80°C. Las muestras de suero pre-dosis para cada animal se usaron como controles negativos.

- 2 placas Immulon™ (DYNEX® Technologies, Inc.) se revistieron durante la noche a 2-8°C con 100 µl/pocillo de un anticuerpo monoclonal de idiotipo anti-OST577-IgG1 de ratón (OST577-γ1) anti-id, , Protein Design Labs™, Inc.) a
- 30 1,0 µg/ml en PBS. Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBST/Tween (solución salina tamponada con fosfato, 0,1% de Tween 20), se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel y se bloquearon con 300 µl/pocillo de tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS (Pierce Chemical Company) durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Los calibradores, controles de suero positivos y negativos, y las muestras de suero se descongelaron y llevaron hasta la temperatura ambiente antes de usar. Los calibradores, controles de
- 35 suero positivos y negativos, y las muestras de suero se diluyeron a 1: 10 en de tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS. Las muestras de suero se pre-diluyeron de forma adecuada (1:10 a 1:80) en PNRS, después se diluyeron a 1:10 en tampón de bloqueo SuperBlock® en PBS. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. Los calibradores diluidos, controles séricos positivos y negativos, y las muestras de suero se añadieron a 100 µl/pocillo en pocillos por duplicado y se incubaron durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de
- 40 PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. El anticuerpo conjugado con HRP anti-cadena ligera de lambda humano de cabra (Southern Biotechnology Associates, Inc.) se preparó mediante dilución de 1:1000 en PBSBSA/Tween (solución salina tamponada con fosfato, 0,5% de seroalbúmina bovina, 0,1% de Tween 20), se añadieron a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 60 ± 5 minutos a temperatura ambiente, Las placas se
- 45 lavaron tres veces con 300 µl/pocillo de PBS/TWEEN y se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. Se añadió ABTS Peroxidasa Sustrato/Peroxidasa Solución B (Kirkegaard & Perry Laboratories) a 100 µl/pocillo y se incubaron durante 7 ± 1 minuto. El desarrollo se detuvo mediante la adición de solución de detención de sustrato (2% de ácido oxálico) a 100 µl/pocillo . La absorbancia a 415 nm se midió en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de detención de sustrato usando un lector de placa de microtitulación VERSAmax™ (Molecular
- 50 Devices Corporation®).

Se preparó una curva de calibración usando los valores medios de la absorbancia obtenidos de los calibradores y el ajuste de los datos a una curva de regresión logística de cuatro parámetros usando SOFTmax® PRO, versión 4.0 (Molecular Devices Corporation®). El valor de la absorbancia media para el calibrado 0,0 ng/ml se restó de cada valor de la absorbancia obtenido para los calibradores. Las concentraciones del control de suero positivo se

determinaron después de restar el valor medio de la absorbancia obtenido para el control de suero negativo a partir de cada valor de la absorbancia obtenido para los controles de suero positivos. Las concentraciones correspondientes a los valores medios de la absorbancia resultantes se obtuvieron mediante interpolación a partir de la curva de calibración. Las concentraciones de las muestras de suero se determinaron restando el valor medio de la absorbancia del control de suero negativo del valor de la absorbancia de cada muestra, realizando el promedio de los valores de la absorbancia resultantes, derivando la concentración correspondientes a los valores medios de la absorbancia mediante interpolación a partir de la curva de calibración y multiplicando la concentración resultante por el factor de pre-dilución, si existe, para llegar a la concentración final de cada muestra.

El intervalo cuantitativo estimado del ensayo fue de 0,10-0,90. El ensayo se consideró adecuado cuando se cumplieron las dos condiciones siguientes: (1) la concentración retrocalculada media de los tres calibradores en el intervalo cuantitativo estaba dentro del 20% de su valor nominal; y (2) los resultados medios calculados de cuatro de seis controles de suero positivos estaban dentro del 30% de su valor nominal, y al menos un resultado medio de cada nivel de concentración estaba dentro del 30% de su valor nominal. Los datos de las placas que no cumplieran los criterios anteriores se rechazaron. Los datos de las muestras de suero individuales se rechazaron cuando se cumplió cualquiera de las siguientes tres condiciones: (1) los valores de absorbancia en los pocillos por duplicado diferían entre sí en más del 40%; (2) la concentración media calculada estaba por debajo del límite inferior de cuantificación (LLOQ) del ensayo (0,10 µg/ml); (3) la concentración media calculada estaba por encima del límite superior de cuantificación (ULOQ) del ensayo (0,90µg/ml). Si el resultado calculado de las muestras por duplicado difería en más del 40 % entre sí, la muestra se volvió a analizar en un segundo ensayo independiente. Si el resultado calculado medio del segundo ensayo estaba dentro del 15 % del resultado medio calculado del primer ensayo para la muestra en cuestión, se usó el resultado medio calculado del primer ensayo. Por otro lado, la muestra se reanalizó en un tercer ensayo independiente y se realizó el promedio de los resultados de los tres ensayos, a menos que se pudiera eliminar un valor mediante prueba de desviación. En este caso, se indicó la media de los dos valores restantes

Resultados:

Los datos de la concentración del anticuerpo en suero se ajustaron con un modelo de dos compartimentos usando WinNonlin® Enterprise Edition, versión 3.2 (Pharsight® Corporation, Mountain View, CA). El modelo supone una distribución de primer orden y una tasa de eliminación de primer orden y ajusta bien los datos. Los datos del modelo (simulados sobre la base del valor medio geométrico de cada grupo de los parámetros farmacocinéticos primarios), así como la concentración media (µg/ml) de los anticuerpos en suero observada y la desviación estándar para cada grupo de cuatro animales se representaron como una función del tiempo (días después de la infusión) usando GraphPad Prism®, versión 3.02 (GraphPad™ Software, Inc.). Como se muestra en la figura 20, los datos indican que las concentraciones medias de anticuerpo en suero de las variantes M428L y T250Q/M428L de OST577-IgG1 se mantuvieron a niveles mayores que con OST577-IgG2M3 salvaje en todos los puntos de tiempo.

Se calcularon varios parámetros farmacocinéticos a partir de los datos usando WinNonlin® Enterprise Edition, versión 3.2 (Pharsight® Corporation). El análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos se calculó usando GraphPad Prism®, versión 3.02 (GraphPad™ Software, Inc.) Como se muestra en la Tabla 10, la C_{max} fue muy similar entre los tres grupos de ensayo, lo que indica que los anticuerpos administrados estaban distribuidos en la circulación de un modo similar. Por tanto, las concentraciones mayores de anticuerpo de los anticuerpos mutantes de IgG1 siguiendo la fase de distribución son atribuibles a su mayor persistencia en el suero. El análisis del aclaramiento medio (CL) indicó que éste era el caso. El VI medio, el volumen de anticuerpo en suero eliminado por unidad de tiempo fue aproximadamente 2,3 veces menor para la variante T250Q/M428L ($0,0811 \pm 0,0191$ ml/h/kg; $p = 0,029$) en comparación con el OST577-IgG1 salvaje ($0,190 \pm 0,022$ ml/h/kg) (Tabla 10), lo que indica una disminución significativa del aclaramiento de OST577-IgG1 M428L y las variantes T250Q/M428L de la circulación de monos rhesus en comparación con los anticuerpos de tipo salvaje.

Los perfiles FC de las variantes de OST577-IgG1 se analizaron adicionalmente calculando otros parámetros (Tabla 10). La AUC media fue aproximadamente 2,4 veces mayor que la variante T250Q/M428L ($12,900 \pm 3,000$ hr*µg/ml; $p = 0,029$) en comparación con OST577-IgG1 salvaje ($5,320 \pm 590$ hr*f, µg/ml) (Tabla 10), lo que indica un incremento significativo de la exposición total de la variante OST577-IgG1 T250Q/M428L en comparación con el anticuerpo salvaje.

Por último, la semivida media de eliminación (β -fase) fue aproximadamente 2,5 veces mayor para la variante T250Q/M428L (838 ± 187 hr, $p = 0,029$) en comparación con OST577-IgG1 salvaje (336 ± 34 hr) (Tabla 10). La semivida de eliminación para OST577-IgG1 salvaje en este estudio es similar a la de OST577-IgG1 (324 ± 85 h) en un estudio FC previo con monos rhesus (Ehrlich et al., op. cit.).

TABLA 10

Nombre ^a (IgG1)	Cmáx ^b (µg/ml)	CL ^c (ml/h/kg)	AUC ^d (h*,µg/ml)	Semivida de eliminación ^e (h)
Salvaje	26,0 ± 4,1	0,190 ± 0,022	5320 ± 590	336 ± 34
T250Q/M428L	29,1 ± 3,7	0,0811* ± 0,0191	12900* ± 3000	838* ± 187

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^b Los valores de Cmáx (± S.D.) se expresan y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 10.

^c Los valores de CL (± S.D.) se expresan en ml/h/kg y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 10.

^d Los valores de AUC (± S.D.) se expresan en h*µg/ml y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 10.

^e Los valores de la semivida de eliminación (SD) se expresan en h y se calcularon a partir de los datos FC usando WinNonlin como se ha descrito en el Ejemplo 10.

*Indica una diferencia significativa (p < 0,060) entre el grupo salvaje y cada grupo mutante. Se realizaron pruebas de Mann-Whitney usando GraphPad Prism como se ha descrito en el Ejemplo 10.

Ejemplo 11

- 5 Este ejemplo describe la aplicación de varios análisis de unión descritos en los Ejemplos 6 y 7 a los mutantes de los anticuerpos IgG3 y IgG4.

Mutagénesis:

- 10 Se usó el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con solapamiento-extensión (Higuchi, op. cit.) para generar sustituciones dirigidas a sitio en la posición 428 de la cadena pesada Hu1D10-IgG3 o en las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada de Hu1D10-IgG3 (numerado de acuerdo con el índice de UE de Kabat y col., op. cit.). Se generó un mutante M428L en la cadena pesada de Hu1D10-IgG3. Los mutantes M428L y T250QM428L se generaron en la cadena pesada de Hu1D10-IgG4.

Transfecciones:

- 15 Los vectores de expresión de la cadena pesada de Hu1D10-IgG3 or Hu1D10-IgG4 mutante o salvaje, descritos con detalle en los Ejemplos 1 y 2, se transfeccionaron de forma conjunta con el vector de expresión de la cadena ligera pVk-Hu1D10 en la línea de células de riñón humano 293-H (Life Technologies®). Los vectores de expresión Hu1D10-IgG3 or Hu1D10-IgG4 también se cotransfeccionaron de forma estable con el vector de expresión pVk-Hu1D10 en células Sp2/0, como se describe en el ejemplo 5. Para las transfecciones estables en Sp2/0, Los vectores de expresión IgG3 se linealizaron con FspI; no obstante, los vectores de expresión IgG4 se linealizaron con BstZ171, ya que en pHuHC.g4.Tt.D-Hu1D10 hay dos sitios FOPI.
- 20

Purificación de anticuerpos:

- Los sobrenadantes de los cultivos que contienen anticuerpos IgG4 se cuantificaron mediante ELISA, se recogieron mediante centrifugación, se filtraron en esterilidad y se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A, como se describe en el Ejemplo 5.
- 25 Los sobrenadantes de los cultivos que contienen anticuerpos IgG3 se cuantificaron mediante ELISA, se recogieron mediante centrifugación, como se describe en el Ejemplo 5. El pH de los sobrenadantes filtrados se ajustó mediante la adición de un volumen 1/75 de Tris-HCl 1M, Ph 8,0. Los sobrenadantes se pasaron por una columna de HP de proteína A de 1 ml HiTrap® (Amersham Biosciences™ Corporation, Piscataway, NJ) que se pre-equilibró con fosfato sódico 20 mM, pH 7,0. La columna se lavó con el mismo tampón y el anticuerpo unido eluyó con glicina-HCl 100 mM, pH 2,7. Tras neutralizar mediante la adición de un volumen de ~ 1/50 Tris-HCl 1M, pH 8,0, las fracciones combinadas de proteínas se dializaron durante la noche en citrato sódico, NaCl 120 mM, a Ph 6,0 o se pasaron por
- 30

una columna de desalación de 5 ml HiTrap® (Amersham Biosciences™ Corporation) que se pre-equilibró con citrato sódico 20 mM, NaCl 120 mM, pH 6,0. El caudal de la columna de desalación se recogió y las fracciones se con $DO_{280} > 0,1$ se combinaron y concentraron hasta ~ 0,5-1,0 mg/ml usando concentradores de 2 ml Vivaspín® (50.000 dalton MWCO) (Vivascience® AG). El material dializado se concentró del mismo modo. Después, las muestras se filtraron en esterilidad usando microfiltros de 0,2 µm Millex®-GV (Millipore® Corporation). Las concentraciones de los anticuerpos purificados se determinaron mediante espectroscopia UV midiendo la absorbancia a 280 nm ($1 \text{ mg/ml} = 1,4 A_{280}$).

SDS-PAGE:

Muestras de cinco µg de anticuerpos purificados se pasaron en condiciones reductoras y no reductoras como se describe en el Ejemplo 5.

Ensayos de unión competitiva:

Como se ha descrito en el ejemplo 6, transfectantes NS0 que expresan FcRn humano o de rhesus unidos a GPI recombinante sobre la superficie se mantuvieron en medio de selección con ácido micofenólico (MPA) (DMEM, 10 % de FBS, medio con suplemento 1xHT Hybri-Max® (Sigma®), 250 µg/ml de xantina (Sigma®), 1 µg/ml de ácido micofenólico (Life Technologies®) y L-glutamina 2 mM) o medio de selección 2x MPA.

Se realizó una serie de diluciones de cada anticuerpo Hu1D10-IgG3 purificado contra IgG humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) que se ha marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). Se analizó la unión de los anticuerpos al FcRn humano en la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3 y al FcRn de rhesus en la línea celular NS0 RhFcRn, clon R-3. Aproximadamente 2×10^5 células/ensayo se lavaron una vez en FBB, pH 8,0, y una vez en FBB, pH 6,0, después se resuspendieron en 120 µl de anticuerpo IgG humano biotinilado pre-mezclado (8,3 µg/ml del anticuerpo competidor Hu1D10-IgG3 (diluciones en serie por dos comenzando desde 625 µg/ml a 0,305 µg/ml) en FBB, pH 6,0. Las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos durante 1 hora en hielo, se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 25 µl de conjugado estreptavidina-RPE ((BioSource International) diluido a 2,5 µg/ml en FBB, pH 6,0. Tras incubación durante 30 minutos en hielo en oscuridad, las células se lavaron dos veces en FBB, pH 6,0, y se resuspendieron en 1% de formaldehído. Las muestras se analizaron para determinar la unión del anticuerpo al FcRn mediante FACS™ usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD® Biosciences).

Una serie de dilución de cada anticuerpo Hu1D10-IgG4 purificado se enfrentó a la IgG humana (Sigma-Aldrich) que se había marcado con biotina (Pierce Biotechnology, Inc.). Los anticuerpos IgG4 se analizaron para determinar la unión a FcRn humano en la línea celular NS0 HuFcRn. (memb), clon 7-3 y al FcRn de rhesus en la línea celular NS0 RhFcRn, clon R-3, como se ha descrito anteriormente para los anticuerpos IgG3.

Ensayo de liberación y unión dependiente de pH:

Los anticuerpos Hu1D10-IgG3 y Hu1D10-IgG4 mutantes purificados se compararon con los respectivos anticuerpos de tipo salvaje según la unión a FcRn humano o de rhesus y, después, se liberaron a varios valores de pH en ensayos de liberación y de unión de un solo punto usando la línea celular NS0 HuFcRn (memb), clon 7-3 y NS0 RhFcRn, clon R-3, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 7. Para asegurar que ambos subtipos, IgG3 and IgG4, se habían marcado de forma equivalente se usaron 25 µl de anticuerpo kappa anti-humano F(ab')₂ de cabra conjugado con FITC (Southern Biotechnology Associates, Inc.) diluido a 1,25 µg/ml en FBB del pH adecuado como reactivo de detección.

Resultados:

Se generaron sustituciones de aminoácidos en la posición 428 de la cadena pesada γ3 humana y en las posiciones 250 y 428 de la cadena pesada γ4 humana (numerados de acuerdo con el índice de la UE de Kabat et al., op. cit.). Estas dos posiciones se escogieron sobre la base de la identificación de mutaciones en estas posiciones en la cadena pesada γ2M32M3 que tuvo como resultado un aumento o disminución de la unión a FcRn. El mutante M428L se evaluó en la cadena pesada γ3 humana. El mutante M428L y el mutante T250Q/M428L se evaluaron en la cadena pesada γ4 humana.

Los mutantes de Fc de IgG3 e IgG4 se expresaron en forma de anticuerpos anti-alelo de la cadena β del HLA-DR, que comprenden las regiones variables de la cadena ligera y pesada de Hu1D10 (Kostelny et al. (2001), op. cit.), la región constante de la cadena ligera del kappa humano (Hieter et al. (1980), op. cit.), y las regiones constantes de la cadena pesada del mutante IgG3 humano (Huck et al., op. cit.) e IgG4 (Ellison et al., op. cit.), respectivamente. Como se ha descrito en lo que antecede, el vector de expresión adecuado salvaje o de cadena pesada mutante se co-transfeccionó de forma transitoria con el vector de expresión adecuado de cadena ligera en células 293-H para

la expresión de los anticuerpos monoclonales Hu1D10. El análisis ELISA de los sobrenadantes de los cultivos recogidos 5-7 días después de la transfección transitoria mostró niveles de expresión de anticuerpos que normalmente eran de 5-25 µg/ml en 25 ml del sobrenadante. Los anticuerpos Hu1D10-IgG3 and Hu1D10-IgG4 se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando la proteína G y la proteína A, respectivamente, para un rendimiento final de aproximadamente 100-500 µg. La expresión estable de los anticuerpos Hu1D10 en las células Sp2/0 normalmente dieron como resultado niveles de expresión de 30-100 µg/ml, determinado mediante ELISA. Se obtuvieron rendimientos de aproximadamente 50-80% del anticuerpo presente en los sobrenadantes de los cultivos mediante cromatografía de afinidad con proteína G o proteína A a pequeña escala.

Los anticuerpos purificados se caracterizaron mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras. El análisis SDS-PAGE en condiciones no reductoras indicó que los anticuerpos purificados tenían un peso molecular de aproximadamente 150-170 kD (datos no mostrados); el análisis en condiciones reductoras indicó que los anticuerpos purificados estaban compuestos por una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50-60 kD y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kD (datos no mostrados). El análisis SDS-PAGE de los anticuerpos purificados de transfectantes estable con Sp2/0 dio resultados similares a los observados con los anticuerpos purificados de transfecciones transitorias con 293-H.

La unión relativa de los anticuerpos Hu1D10-IgG3 y Hu1D10-IgG4 de tipo salvaje y sus diversos mutantes a cRn se determinó usando una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable FcRn humano en su superficie. Como se ha descrito anteriormente, se analizó la unión de los anticuerpos purificados a FcRn en ensayos de unión competitiva. Crecientes concentraciones de los anticuerpos competidores sin marcar se incubaron con células en presencia de una concentración subsaturante de anticuerpo IgG humano biotinilado (Sigma-Aldrich) en FBB, pH 6,0.

La unión de Hu1D10-IgG3 salvaje y del mutante N428L al FcRn humano se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 11, la CI50 para el anticuerpo Hu1D10-IgG3 salvaje es ~15 µg/ml, mientras que la CI50 para el mutante sencillo M428L es de ~2 µg/ml. La unión de Hu1D10-IgG4 y de sus mutantes al FcRn humano se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 12, la CI50 para el anticuerpo Hu1D10-IgG4 salvaje es ~76 µg/ml, mientras que la CI50 para el mutante sencillo M428L es de ~5 µg/ml y la CI50 para el mutante doble T250Q/M428L es ~1 µg/ml.

La unión de Hu1D10-IgG3 salvaje y del mutante N428L al FcRn de rhesus se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 13, la CI50 para el anticuerpo Hu1D10-IgG3 salvaje es ~14 µg/ml, mientras que la CI50 para el mutante sencillo M428L es de ~3 µg/ml. La unión de Hu1D10-IgG4 y de sus mutantes al FcRn de rhesus se analizó en experimentos de unión competitiva. Como se resume en la Tabla 14, la CI50 para el anticuerpo Hu1D10-IgG4 salvaje es ~98 µg/ml, mientras que la CI50 para el mutante sencillo M428L es de ~7 µg/ml y la CI50 para el mutante doble T250Q/M428L es ~1 µg/ml.

Se sabe que la unión de IgG a FcRn depende del pH. La IgG se une fuertemente al FcRn a pH 6,0, pero débilmente a pH 8,0. Con el fin de someter a ingeniería a los anticuerpos mutantes con mayores semividas en suero, es deseable incrementar la unión a FcRn a pH 6,0, manteniendo la liberación dependiente de pH de FcRn a pH 8,0. Para confirmar que la unión dependía del pH, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable el FcRn humano y, después, se libera a valores de pH variables desde pH 6,0 a pH 8,0. Como se ha descrito en lo que antecede, las células se incubaron con una concentración subsaturante del anticuerpo en FBB, pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, o 8,0, y la unión se analizó mediante FACSTM. Como se muestra en la Figura 21A, los resultados indicaron que los anticuerpos Hu1D10-IgG3 modificados con la mutación M428L mostraron una unión fuerte al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Como se muestra en la Figura 21B, los resultados indicaron que los anticuerpos Hu1D10-IgG4 modificados con la mutación M428L o las mutaciones T250Q/M428L mostraron una unión fuerte al FcRn humano a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Estos resultados indicaron que la unión de los anticuerpos IgG3 e IgG4 al FcRn humano era, de hecho, dependiente del Ph.

De forma similar, los anticuerpos se analizaron para determinar la unión a una línea celular NS0 transfeccionada que expresa de forma estable FcRn de rhesus y, después, se libera a valores de pH que varían desde pH 6,0 a pH 8,0. Como se muestra en la Figura 21C, los resultados indicaron que los anticuerpos Hu1D10-IgG3 modificados con la mutación M428L mostraron una unión fuerte al FcRn de rhesus a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Como se muestra en la Figura 21D, los resultados indicaron que los anticuerpos Hu1D10-IgG4 modificados con la mutación M428L o las mutaciones T250Q/M428L mostraron una unión fuerte al FcRn de rhesus a pH 6,0, con disminución de la unión a medida que los valores de pH aumentaban a 8,0. Estos resultados indicaron que la unión de los anticuerpos al FcRn de rhesus era, también, dependiente del

pH.

TABLA 11

Nombre ^a (IgG3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	14,5 ± 3,6	1,0
M428L	3	2,29 ± 0,39	6,3

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente a la IgG (Sigma-Aldrich) humana en FBB, a pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 11.

^d La unión relativa al FcRn de rhesus se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo OST577-IgG1 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 12

Nombre ^a (IgG4)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	76,1 ± 12,7	1,0
M428L	3	5,03 ± 0,45	15
T250Q/M428L	3	1,07 ± 0,14	71

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente la IgG (Sigma-Aldrich) humana en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 11.

^d La unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo Hu1D10-IgG4 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

5

TABLA 13

Nombre ^a (IgG3)	n ^b	CI50(µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	13,8 ± 1,0	1,0
M428L	3	3,03 ± 0,44	4,6

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente la IgG (Sigma-Aldrich) humana en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 11.

^d La unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo Hu1D10-IgG3 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

TABLA 14

Nombre ^a (IgG4)	n ^b	CI ₅₀ (µg/ml) ^c	Unión relativa ^d
Salvaje	3	98,4 ± 5,8	1,0
M428L	3	6,64 ± 1,05	15
T250Q/M428L	3	1,27 ± 0,13	77

^aPara cada mutante, la primera letra indica el aminoácido salvaje, el número indica la posición de acuerdo con el índice UE (Kabat et al., op. cit.) y la segunda letra indica el aminoácido mutante.

^bn indica el número de ensayos independientes.

^cValores de CI50 ((± S.D.) se expresan en µg/ml (sobre la base de las concentraciones finales del competidor) y se calcularon en ensayos de unión competitiva frente la IgG (Sigma-Aldrich) humana

en FBB, pH 6,0, como se describe en el Ejemplo 11.

^d La unión relativa al FcRn humano se calculó en forma de la proporción entre el valor CI50 del anticuerpo Hu1D10-IgG4 salvaje y el de cada uno de los mutantes.

Ejemplo 12

Este ejemplo describe la aplicación de los ensayos de semivida en suero in vivo e in vitro descritos en los Ejemplos 9 y 10 a los mutantes de los anticuerpos IgG3 e IgG4.

- 5 Los protocolos del "Estudio de Farmacocinética en Rhesus" como se describe en los Ejemplos 9 y 10 se llevan a cabo en mutantes de IgG3 and IgG4 para confirmar el efecto de las mutaciones en la semivida en suero in vivo y los diversos parámetros farmacocinéticos.

Ejemplo 13

- 10 Este ejemplo describe el diseño y producción de los mutantes de unión a FcRn de los anticuerpos terapéuticos bien conocidos de modo que extienden (o disminuyen) la semivida en suero de cada uno para permitir mejores regímenes terapéuticos para os pacientes.

Daclizumab:

- 15 Daclizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD25 humanizado que está en desarrollo clínico para una serie de indicaciones de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, incluidas asma diabetes, uveítis, esclerosis múltiple, artritis reumatoide y colitis ulcerosa. Daclizumab está actualmente comercializado con la marca Zenapax® solo para indicaciones en transplantes.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada para daclizumab se han divulgado en la patente de EE.UU. nº 5,530,101.

- 20 Daclizumab en su realización clínica actual es un anticuerpo del isotipo IgG1, no obstante, se puede producir una versión de isotipo IgG2M3 que exhibe similares características terapéuticas.

- 25 Con el fin de incrementar la semivida en suero de daclizumab se puede modificar su secuencia de aminoácidos de la región constante con cualquiera de las mutaciones de unión a FcRn descritas anteriormente. Por ejemplo, la mutación T250Q/M428L se puede producir en daclizumab usando los procedimientos para el diseño del vector y la mutagénesis descritos en los Ejemplos 1-4 anteriores. La secuencia de daclizumab T250Q/M428L se representa en la Figura 22 (SEC ID Nº 122).

La mayor semivida en suero de daclizumab T250Q/M428L se puede determinar usando los procedimientos de ensayo de unión in vitro descritos en los Ejemplos 5-7 o usando los procedimientos de ensayo in vivo descritos en los Ejemplos 9-10.

- 30 Cabe esperar que daclizumab T250Q/M428L proporcione los beneficios terapéuticos del daclizumab no alterado con las ventajas de menor frecuencia y cantidad de dosis,

- 35 Las otras mutaciones de unión a RcRn en las secuencias de las regiones constantes de daclizumab (isotipo IgG1 isotype), como se representa en la Figura 22 (SEC ID Nº 119-123), también se pueden producir de acuerdo con los procedimientos de los Ejemplos 1-3 anteriores. Cabe esperar que estos mutantes afecten también a la semivida en suero de daclizumab como se indica en base a los efectos de estas mutaciones en los ejemplos de los anticuerpos OST577 y Hu1D10 anteriores.

De un modo similar, la mutación de unión a FcRn en una versión de IgG2M3 de las secuencias de las regiones constantes de daclizumab, como se representa en la Figura 22 (SEC ID Nº 124-128), también se pueden producir de acuerdo con los procedimientos de los Ejemplos 14 anteriores.

Fontolizumab:

- 40 Fontolizumab es un anticuerpo monoclonal anti-interferón gamma (IFN-γ) humanizado del isotipo IgG1 también conocido como HuZAF™. Fontolizumab está actualmente en desarrollo clínico como tratamiento terapéutico para la enfermedad de Crohn. Las secuencias de la región variable de fontolizumab se divulgan en la patente de EE.UU. nº 6,329,511.

Como se ha descrito anteriormente para daclizumab, la semivida de fontolizumab también se puede alterar mutando sus secuencias de la región constante como se muestra en la Figura 23 (SEC ID N° 130-134) usando los procedimientos descritos anteriormente en los Ejemplos 1-4.

(Racémico)

- 5 Visilizumab es un anticuerpo monoclonal anti-CD3 humanizado del isotipo IgG2 también conocido como Nuvion®. Visilizumab está dirigido a las moléculas de CD3, que forman el complejo antígeno-receptor de todas las células T manduras. Visilizumab está actualmente en desarrollo clínico como tratamiento de la colitis ulcerosa refractaria a esteroides. Como se ha descrito anteriormente para daclizumab y fontolizumab, la semivida de visilizumab también se puede alterar mutando sus secuencias de la región constante como se muestra en la Figura 24 (SEC ID N° 136-140) usando los procedimientos descritos anteriormente en los Ejemplos 14.
- 10

M200:

- M200 es un anticuerpo IgG4 quimérico dirigido a la $\alpha 5\beta 1$ integrina, que actualmente está en desarrollo como terapia de inhibición de la angiogénesis dirigida a varios trastornos proliferativos. Como se ha descrito anteriormente para daclizumab, fontolizumab y visilizumab, la semivida de M200 también se puede alterar mutando sus secuencias de la región constante como se muestra en la Figura 25 (SEC ID N° 142-146) usando los procedimientos descritos anteriormente en los Ejemplos 1-3
- 15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que es modificado a partir de de daclizumab que comprende ácido glutámico o glutamina en el residuo de aminoácido 250 y leucina o fenilalanina en el residuo de aminoácido 428, y en el que los residuos de aminoácidos están numerados por el sistema de numeración de UE para su uso en profilaxis o terapia, en el que

5 a) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina.

b) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina; o

10 c) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es leucina.

2. Moléculas polinucleotídicas que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo de la reivindicación 1.

3. Un vector que comprende las moléculas polinucleotídicas de la reivindicación 2.

4. Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la reivindicación 3,

15 5. Un procedimiento de producción de un anticuerpo modificado de daclizumab de clase IgG con una afinidad de unión por FcRn alterada y/o una semivida en suero alterada en comparación con un anticuerpo de daclizumab sin modificar, en el que el procedimiento comprende

20 a) preparar un vector de expresión, que comprende un promotor adecuado unido de forma operable a ADN que codifica al menos una cadena pesada de la inmunoglobulina del anticuerpo modificado, en la que el residuo de aminoácido 250 de daclizumab está sustituido con ácido glutámico o glutamina y el residuo de aminoácido 428 de daclizumab está sustituido con leucina o fenilalanina, en el que los aminoácidos se numeran mediante el sistema de numeración de la UE, de modo que se produce una alteración en la afinidad de unión a FcRn y/o una semivida en suero respecto al daclizumab sin modificar;

25 b) transformar las células huésped con dicho vector; y

c) cultivar dichas células huésped transformadas para producir dicho anticuerpo modificado, en el que

30 (i) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es ácido glutámico y el residuo de aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina;

(ii) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es fenilalanina; o

35 (iii) el residuo de aminoácido 250 de la región constante de la cadena pesada es glutamina y el residuo aminoácido 428 de la región constante de la cadena pesada es leucina.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende preparar un segundo vector de expresión que comprende un promotor ligado operablemente a ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina complementaria del anticuerpo modificado y transformar adicionalmente dicha línea celular con dicho segundo vector.

40

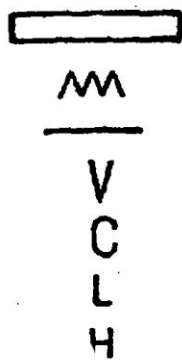
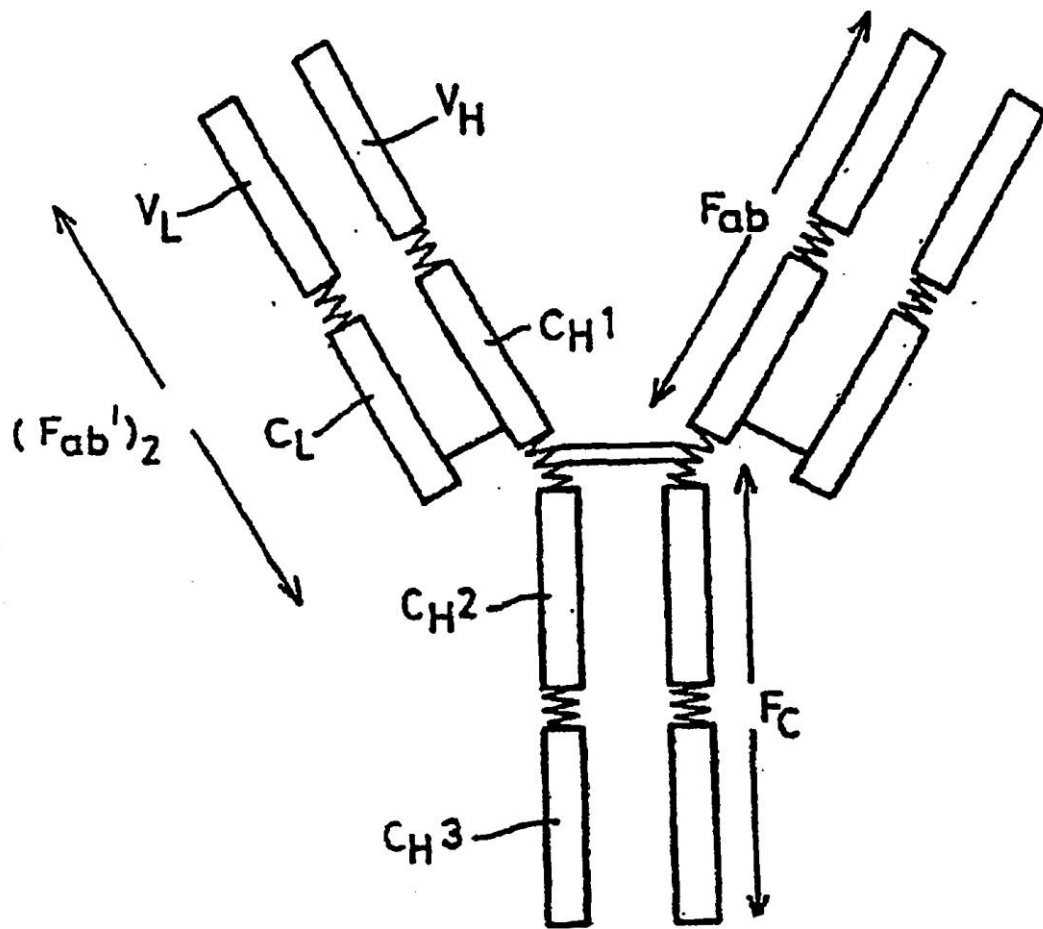


FIG. 1

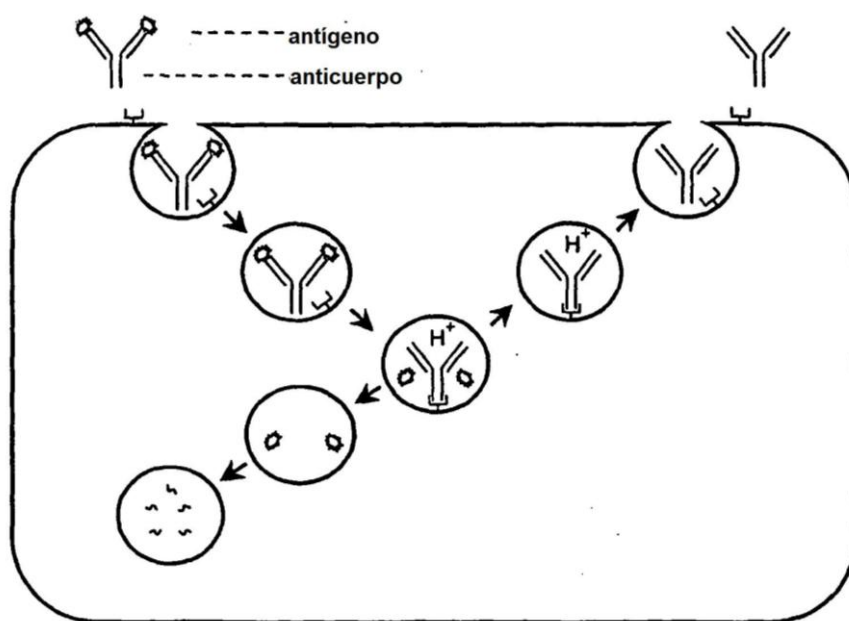


FIG. 2

FIG. 3A Secuencias de aminoácidos de **OST577-IgG2M3** y **OST577-IgG1**

OST577 - VH	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSRYGHHVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKWYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMHSRLRAADTGVYFCANDQLYFGSPGHYWGQGTLVTVSS
IgG2M3 - CH	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSNFGTQTYYTCNVDRHKPSNTKVDKTVVERKCCVCEPCP APPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTK GQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKQKSLSPSK
IgG1 - CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSNFGTQTYYICNVNHRKPSNTKVDKVPKSCDKTHCTCPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTKQKSLSPGK
OST577 - VL	SYVLTQPPSVSVAPGQTARIYTOGGDNIGSKSVNHFQQKPGQAPVLYVYDDNERPSGI SERPSGSGNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVMDSSSDHVVFPGGGTKLTVLG
LAMBDA2 - CL	QPKAAPSVTLFPPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAAKADSSPVKAGVETTTTPSKQENNKCAASVYLSLTPBQWKSHRSYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

FIG. 3B Secuencias de aminoácidos OST577-IgG2M3 y sus mutantes	
IgG2M3	ASTKGPSEVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSNEGTQTTTCNVDRKPSNTKVDKT
T250A	-----
T250C	-----
T250D	-----
T250E	-----
T250F	-----
T250G	-----
T250H	-----
T250I	-----
T250K	-----
T250L	-----
T250M	-----
T250N	-----
T250P	-----
T250Q	-----
T250R	-----
T250S	-----
T250V	-----
T250W	-----
T250Y	-----
L314A	-----
L314C	-----
L314D	-----
L314E	-----
L314F	-----
L314G	-----
L314H	-----
L314I	-----
L314K	-----
L314M	-----
L314N	-----
L314P	-----
L314Q	-----
L314R	-----
L314S	-----
L314T	-----
L314V	-----
L314W	-----
L314Y	-----
M428A	-----
M428C	-----
M428D	-----
M428E	-----
M428F	-----
M428G	-----

FIG. 3B Secuencias de aminoácidos **OST577-IgG2M3** y sus mutantes

M428H	-----
M428I	-----
M428K	-----
M428L	-----
M428N	-----
M428P	-----
M428Q	-----
M428R	-----
M428S	-----
M428T	-----
M428V	-----
M428W	-----
M428Y	-----
T250E/M428F	-----
T250Q/M428F	-----
T250Q/M428L	-----
IgG2M3	BRKCCVCCPPCP
T250A	-----
T250C	-----
T250D	-----
T250E	-----
T250F	-----
T250G	-----
T250H	-----
T250I	-----
T250K	-----
T250L	-----
T250M	-----
T250N	-----
T250P	-----
T250Q	-----
T250R	-----
T250S	-----
T250V	-----
T250W	-----
T250Y	-----
L314A	-----
L314C	-----
L314D	-----
L314E	-----
L314F	-----
L314G	-----
L314H	-----
L314I	-----
L314K	-----

FIG 3B Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG2M3 y sus mutantes

L314M	-----
L314N	-----
L314P	-----
L314Q	-----
L314R	-----
L314S	-----
L314T	-----
L314V	-----
L314W	-----
L314Y	-----
M428A	-----
M428C	-----
M428D	-----
M428E	-----
M428F	-----
M428G	-----
M428H	-----
M428I	-----
M428K	-----
M428L	-----
M428N	-----
M428P	-----
M428Q	-----
M428R	-----
M428S	-----
M428T	-----
M428V	-----
M428W	-----
M428Y	-----
T250E/M428F	-----
T250Q/M428P	-----
T250Q/M428L	-----
IGG2M3	APPAAPSVELFPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFPMWVDGVEVRNAJTKPRSEQFNSTPRVSVLTWVHQDMLAGKEYCKVSNKGLPAPIETISKTK
T250A	-----A-----
T250C	-----C-----
T250D	-----D-----
T250E	-----E-----
T250F	-----F-----
T250G	-----G-----
T250H	-----H-----
T250I	-----I-----
T250K	-----K-----
T250L	-----L-----
T250M	-----M-----
T250N	-----N-----

Fig 3B Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG2M3 y sus mutantes

T250P	P
T250Q	Q
T250R	R
T250S	S
T250V	V
T250W	W
T250Y	Y
L314A	A
L314C	C
L314D	D
L314E	E
L314F	F
L314G	G
L314H	H
L314I	I
L314K	K
L314M	M
L314N	N
L314P	P
L314Q	Q
L314R	R
L314S	S
L314T	T
L314V	V
L314W	W
L314Y	Y
M428A	A
M428C	C
M428D	D
M428E	E
M428F	F
M428G	G
M428H	H
M428I	I
M428K	K
M428L	L
M428N	N
M428P	P
M428Q	Q
M428R	R
M428S	S
M428T	T
M428V	V
M428W	W
M428Y	Y

Fig3B Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG2M3 y sus mutantes

T250E/M428F	-----E-----
T250Q/M428F	-----Q-----
T250Q/M428L	-----Q-----
IgG2M3	GPPEPQVYTLPPSREMTKNOVSLTCLVKGFPDIAVEMSSNGQPPENNYKTTTPMLDSGGSFFLYSKLTVDKSRHQGQNV7PSCSYMHEALRRHHTTKSKLSLSPBK
T250A	-----
T250C	-----
T250D	-----
T250E	-----
T250F	-----
T250G	-----
T250H	-----
T250I	-----
T250K	-----
T250L	-----
T250M	-----
T250N	-----
T250P	-----
T250Q	-----
T250R	-----
T250S	-----
T250V	-----
T250W	-----
T250Y	-----
L314A	-----
L314C	-----
L314D	-----
L314E	-----
L314F	-----
L314G	-----
L314H	-----
L314I	-----
L314K	-----
L314M	-----
L314N	-----
L314P	-----
L314Q	-----
L314R	-----
L314S	-----
L314T	-----
L314V	-----
L314W	-----
L314Y	-----
M428A	-----A-----
M428C	-----C-----
M428D	-----D-----

FIG. 3B Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG2M3 : y sus mutantes

M428E	-----E-----
M428F	-----F-----
M428G	-----G-----
M428H	-----H-----
M428I	-----I-----
M428K	-----K-----
M428L	-----L-----
M428N	-----N-----
M428P	-----P-----
M428Q	-----Q-----
M428R	-----R-----
M428S	-----S-----
M428T	-----T-----
M428V	-----V-----
M428W	-----W-----
M428Y	-----Y-----
T250E/M428F	-----P-----
T250Q/M428F	-----P-----
T250Q/M428L	-----L-----

FIG. 3C Secuencias de aminoácidos de OST577-IgG1 y sus mutantes	
IGG1	ASTKGFSPVFPFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKYDKKV
T250D	-----
T250E	-----
T250Q	-----
M428F	-----
M428L	-----
T250E/M428F	-----
T250Q/M428L	-----
IGG1	EPKSCDKTHITCPPCP
T250D	-----
T250E	-----
T250Q	-----
M428F	-----
M428L	-----
T250E/M428F	-----
T250Q/M428L	-----
IGG1	APELLGGPSVPLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVSVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK
T250D	-----D-----
T250E	-----E-----
T250Q	-----Q-----
M428F	-----
M428L	-----
T250E/M428F	-----E-----
T250Q/M428L	-----Q-----
IGG1	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFPLYSLQ.TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
T250D	-----
T250E	-----
T250Q	-----
M428F	-----P-----
M428L	-----L-----
T250E/M428F	-----P-----
T250Q/M428L	-----L-----

FIG. 3D Secuencias de aminoácidos de **Hu1D10-IgG2M3** γ **Hu1D10-IgG1**

Hu1D10 - VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNVGVHWRQSPGKGLEWIGVKNRSGGSTETNAAPISRLLTISKDTSKNQVSLKLSLTAADTAIVYYCARNDRYAMDYWGQGLVTVSS
IgG2M3 - CH	ASTKGPSVFELAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERRKCCVECPGP APPAAAPSVFLFPPPKDYLMI SKT PEVTCVVDVSHEDPEVQFNWVDGVEVHNATKPREEQNFSTRVSVLTVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTK GQPREPQVYTLPPSR RENT QVSLTCLVKGFTYPSDIAVEWESNGQPENNYK ITTP PMLOSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPSK
IgG1 - CH	ASTKGPSVPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCP AP ELL GGPSVFLFPPPKDYLMI SR TP EV TCVVDVSHEDPEV QFN WVDGVEVHNATKPREEQNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSR DEL TQNQVSLTCLVKGFTYPSDIAVEWESNGQPENNYK ITTP PVLDSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGNVPSCSVHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Hu1D10 - VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENYSYSLAWYQQKPKAPKLLVSNAKTLAQGVPSRPSGSGKQFTLTIS SLQ PEDPATY Y QQHHVGN SY PFQGTTKLEIK
KAPPA - CL	RTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCCLANNFYPREAKVQWKNVDNAIQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG 3E Secuencias de aminoácidos de Hu1D0-IgG1 y sus mutantes

IgG2M3 M428L T250Q/M428L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAAGCLVNDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPAVLASSGLYSLSVVTVTPSSNPGTQTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV ----- -----
IgG2M3 M428L T250Q/M428L	ERKCCVECPQP ----- -----
IgG2M3 M428L T250Q/M428L	APPAAAPSVFLFPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVVHNNAKTKPRBBQFNSTPRVVSFLTVVHQDHLNGKEYKCKVSNKGLPAPLEKTIISKTK ----- -----Q-----
IgG2M3 M428L T250Q/M428L	QQPREPQVYTLPPSRREMTKNQVSLTCLVNGFYPSDIAVSHESNGQPENNYKTTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRHQQGNVPSCSWVHEALHRYTTQKSLSLSPSK ----- -----L-----

IgG1	ASTKGFSPVPIAPSSKSTSGTAAAGCLVKDYFPEPVTVNSNGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSEWTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDIKV	
M428L	-----	
T250Q/M428L	-----	
IgG1	EPKSCDKTHTCPPCP	
M428L	-----	
T250Q/M428L	-----	
IgG1	APELLGGSPVELPPPKPOTLMIISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVNAKTKPRBQXNSTRYVSVLTWLHODMLNGKEYCKVSNQALPAPIEKTISKAK	T250Q/M428L
M428L	-----	
	-----Q-----	
IgG1	GQPREFQVYTIIPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDLSDGSPFLYSKLTVDKSRWQQGVFSCSVWHEALINHTQKSLSLSPGK	
M428L	-----	
T250Q/M428L	-----	

FIG. 3G Secuencias de aminoácidos de Hu1D10-IgG3 y Hu1D10-IgG4

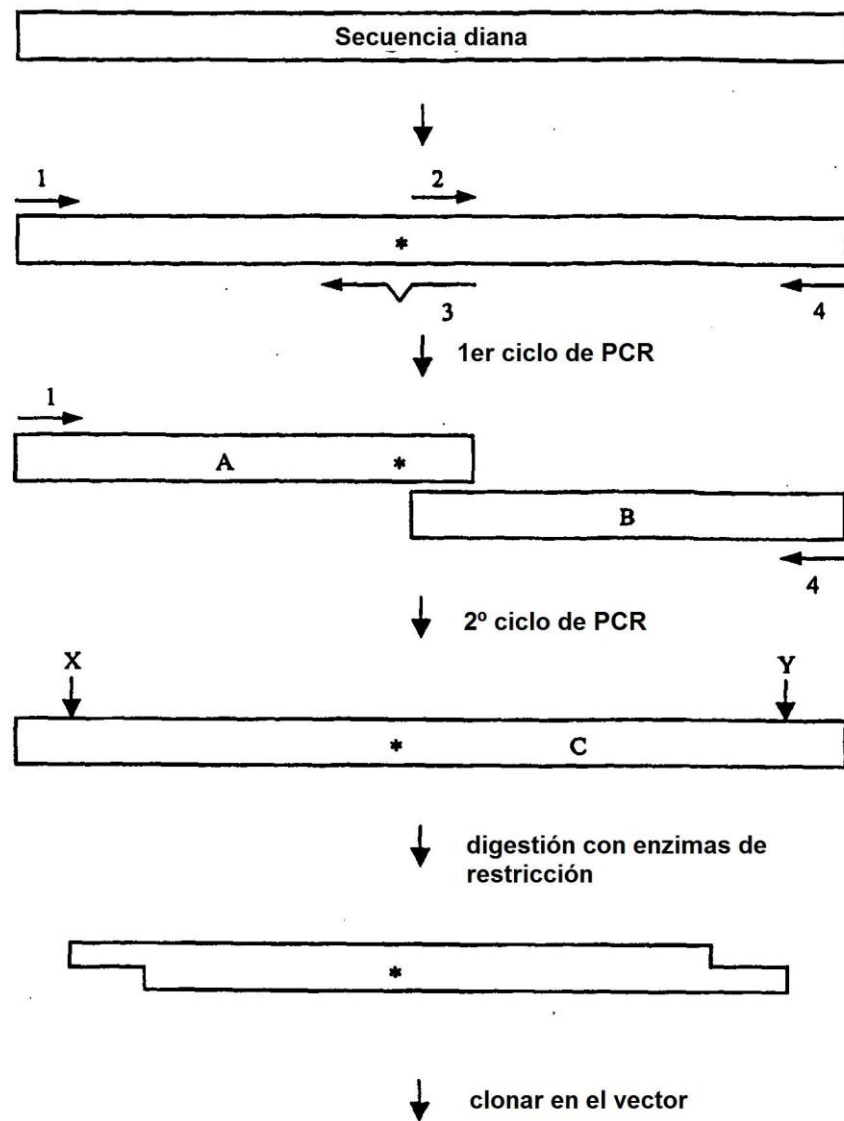
Hu1D10 - VH	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPQKGLEWIGVKWGGSTEXNAAFISRLTISKDTSKNQVSLKLNLSLTAAADTAVYYCARNDRIYANDYWGQGTLLVTVSS
IgG3 - CH	ASTKGPSVFPLA PCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTTCNVNHKPSNTKVDKRV ELKTEFLGDTTHTCPRCPPEPKSCDTPPCPRCPPEPKSCDTPPCPRCPPEPKSCDTPPCPRCP APELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWVDGVEVHNAKTKLREEQYNSTFRRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVNHEALHNRYTQKSLSLSPCK
IgG4 - CH	ASTKGPSVFPELAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSMNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTTCNVDHKPSNTKVDKVESKYGPPCPSCP APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVNHEALHNHYTQKSLSLSLGK
Hu1D10 - VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITTCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLVSNAKTLAEGVPSRFGSGSGKQFTLTISLQPEDFATYYTCQHHYGNSTYFFGQGTKLEIK
KAPPA - CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 3H Secuencia de aminoácidos de Hu1D10-IgG3 y su mutante

IgG3 M428L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYTTCNNVNHKPSNTKVDKRV -----
IgG3 M428L	ELKTPLGDTTHTCPRCP -----
IgG3 M428L	EPKSCDTPPPCPRCP -----
IgG3 M428L	EPKSCDTPPPCPRCP -----
IgG3 M428L	EPKSCDTPPPCPRCP -----
IgG3 M428L	APELLGGPSVFLFPPPKPDTLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVQFKWYDGVVEVHNAKTLREEQYNSTFRVSVLTVLHQDMLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAK -----
IgG3 M428L	GQPREQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNITFCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK -----L-----

FIG. 3I Secuencias de aminoácidos de Hu1D10-IgG4 y sus mutantes

IgG4 M428L T250Q/M428L	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPPSSSLGTKTYTCNVDPHKPSNTKVDIKRV ----- -----
IgG4 M428L T250Q/M428L	ESKYGPEPCSCP ----- -----
IgG4 M428L T250Q/M428L	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAK ----- ----- -----Q-----
IgG4 M428L T250Q/M428L	GQPREPQVYITLPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVWHEALHNHYTQKSLSLSLGK ----- ----- -----L----- -----L-----



* = errores en los cebadores

FIG. 4

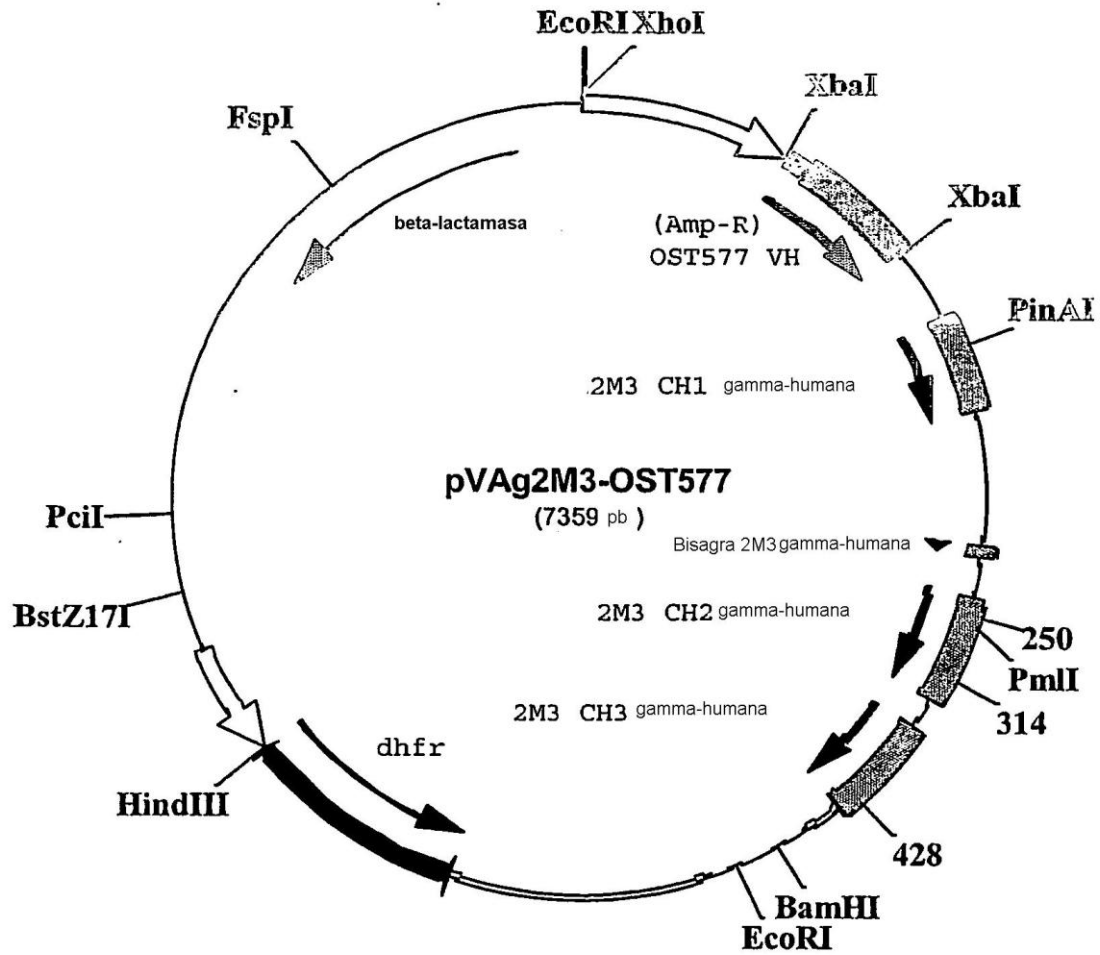


FIG. 5A

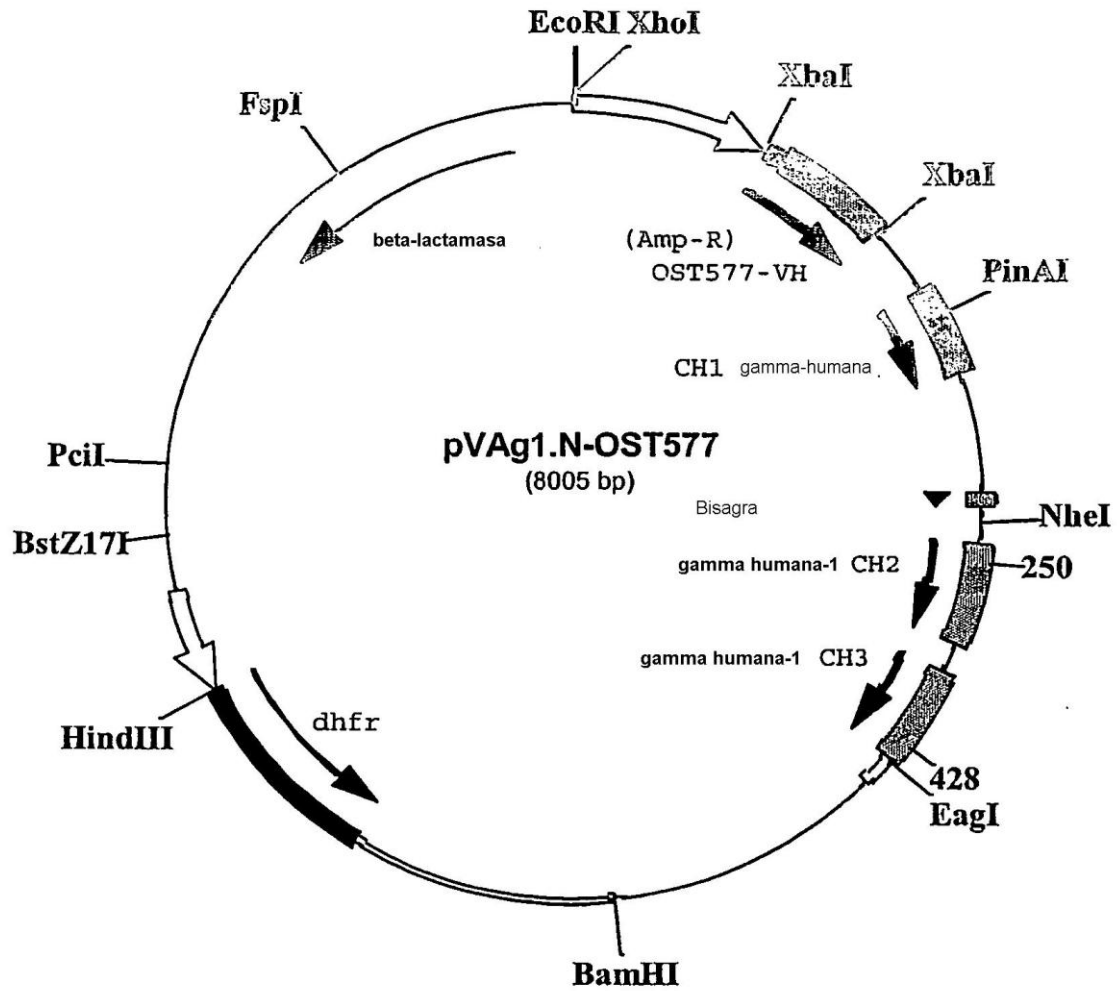


FIG. 5B

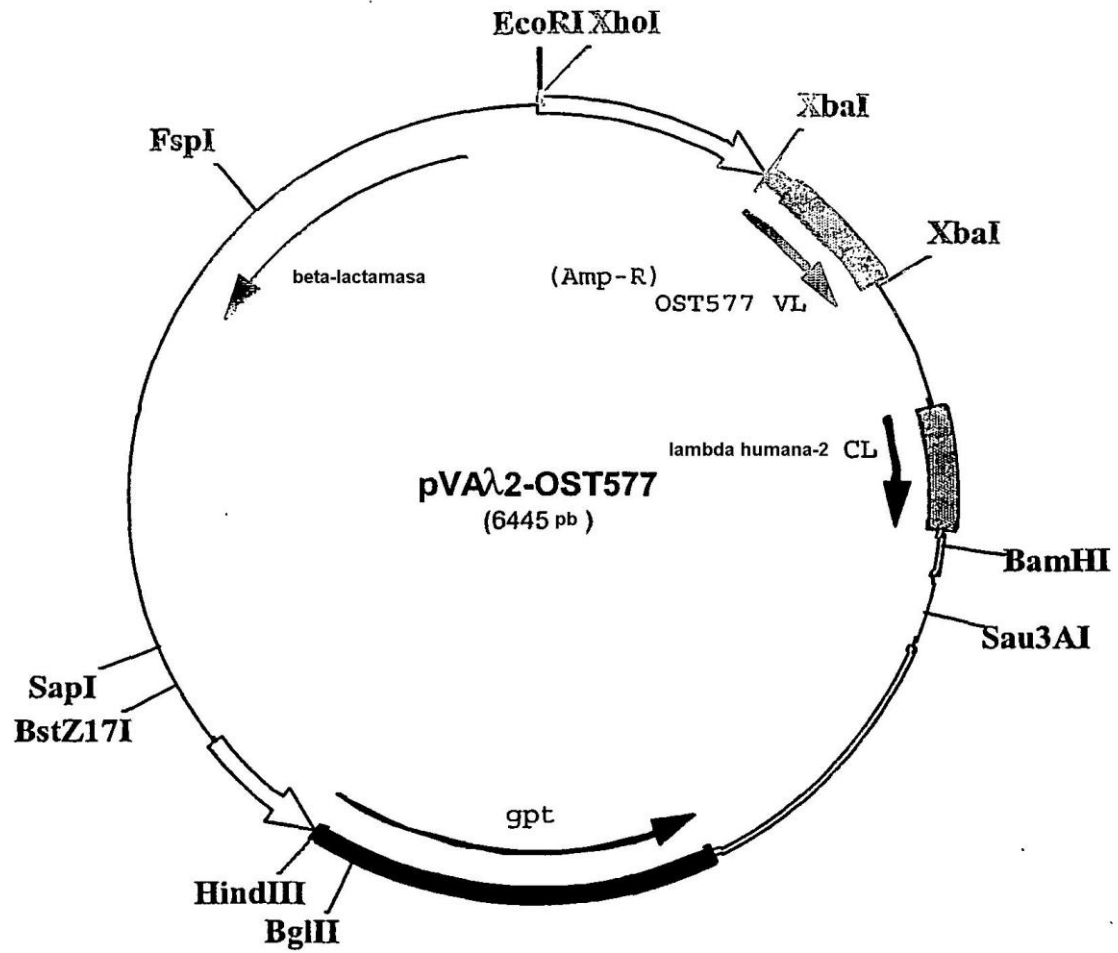


FIG. 6

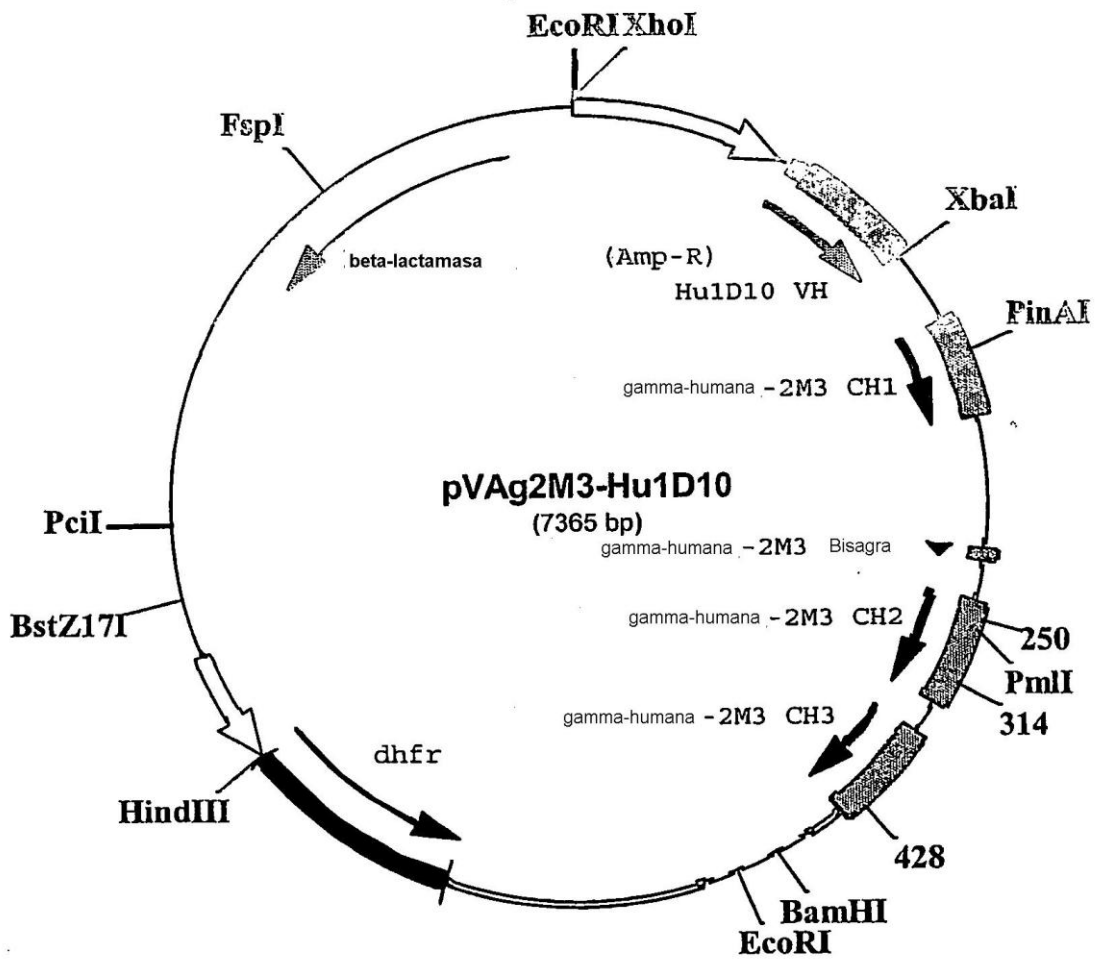


FIG. 7A

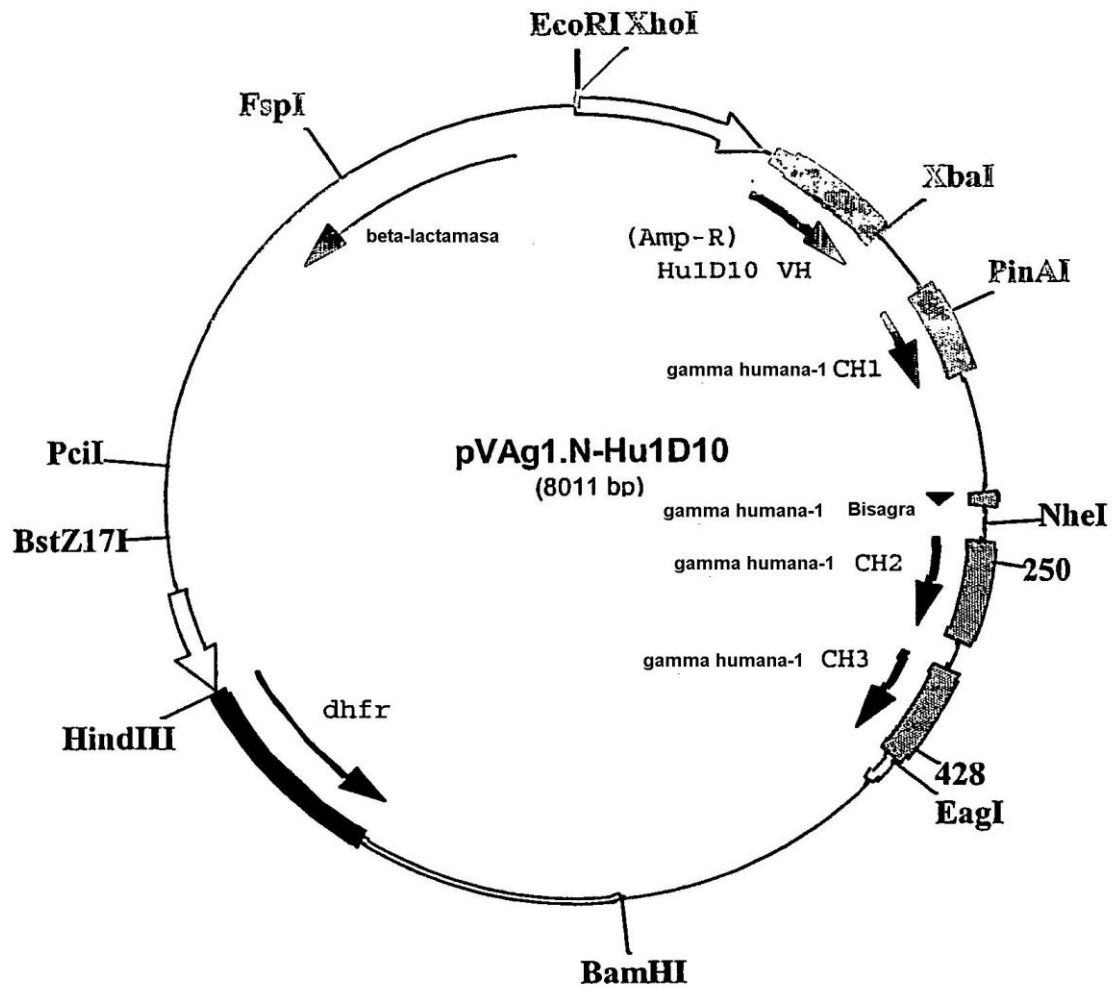


FIG. 7B

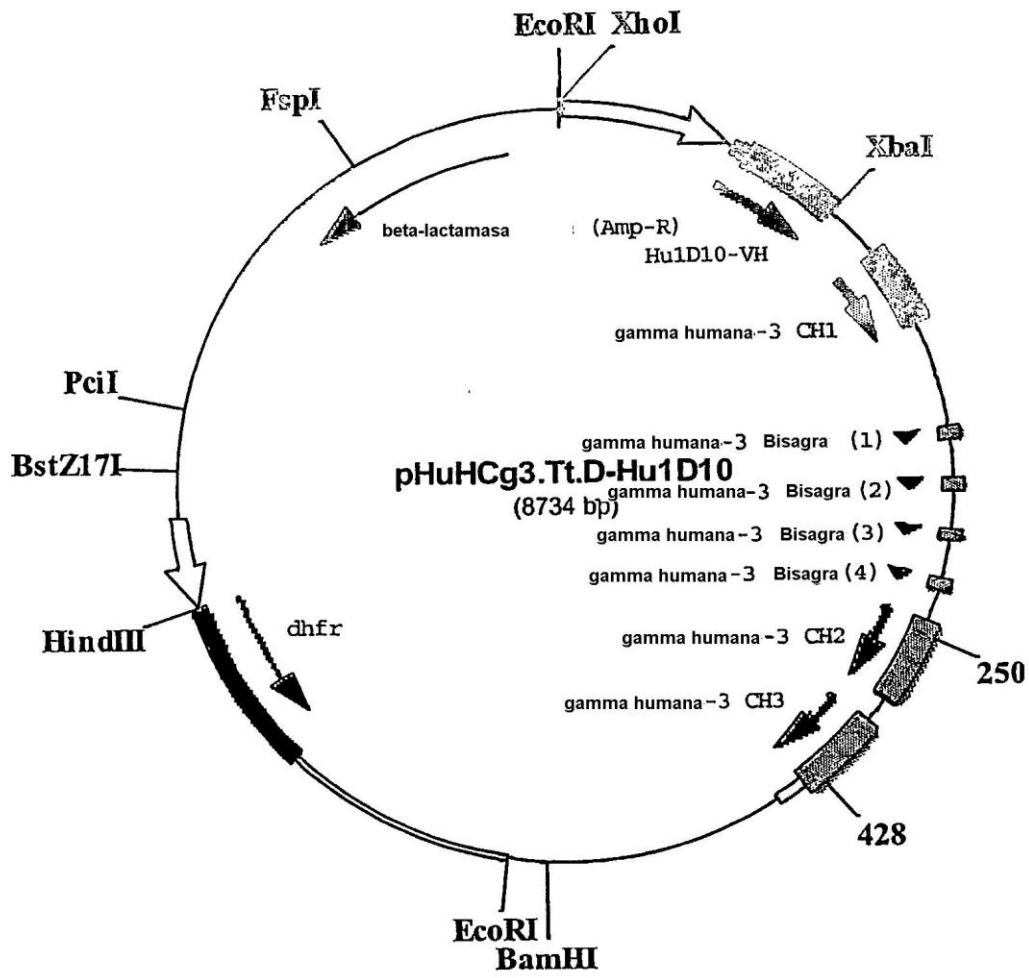


FIG. 7C

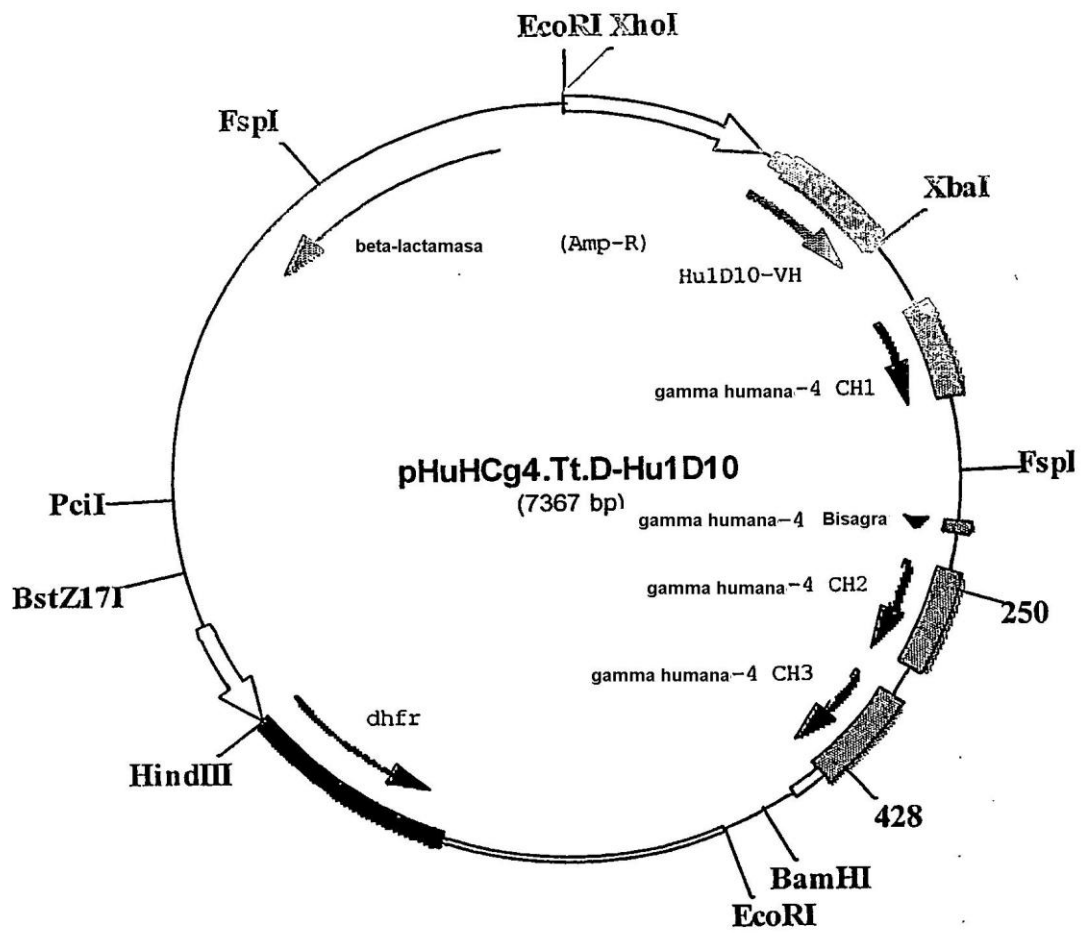


FIG. 7D

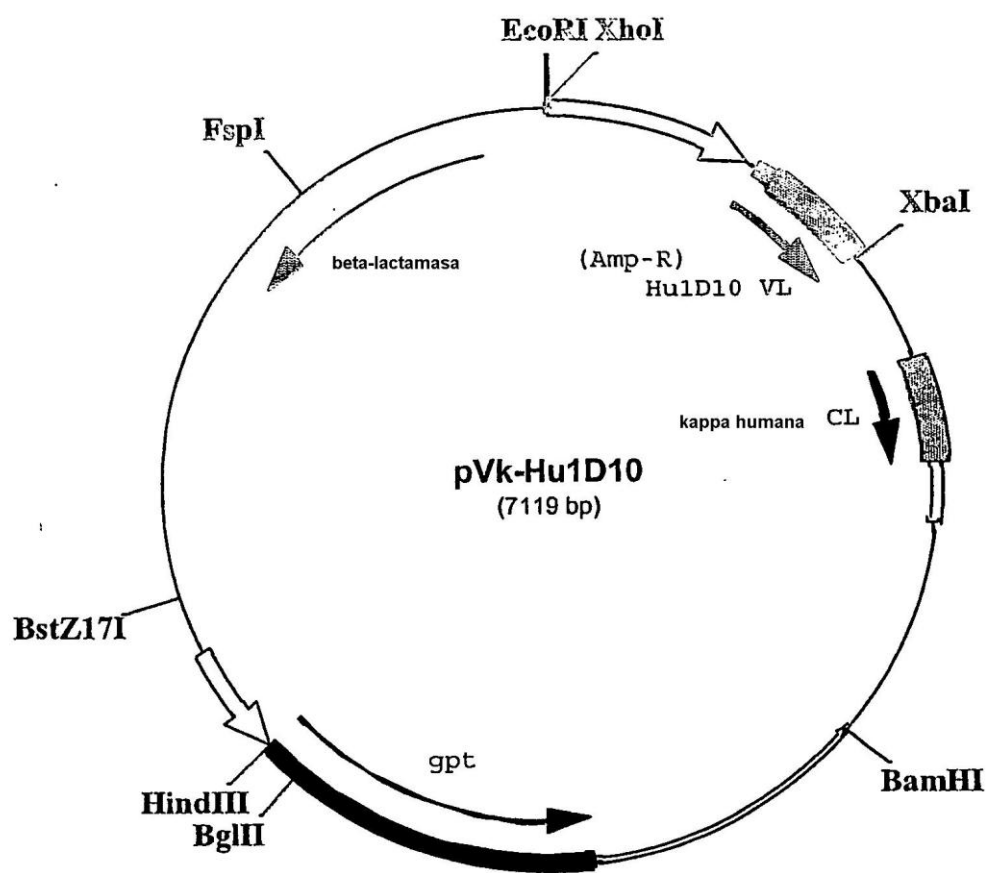


FIG. 8

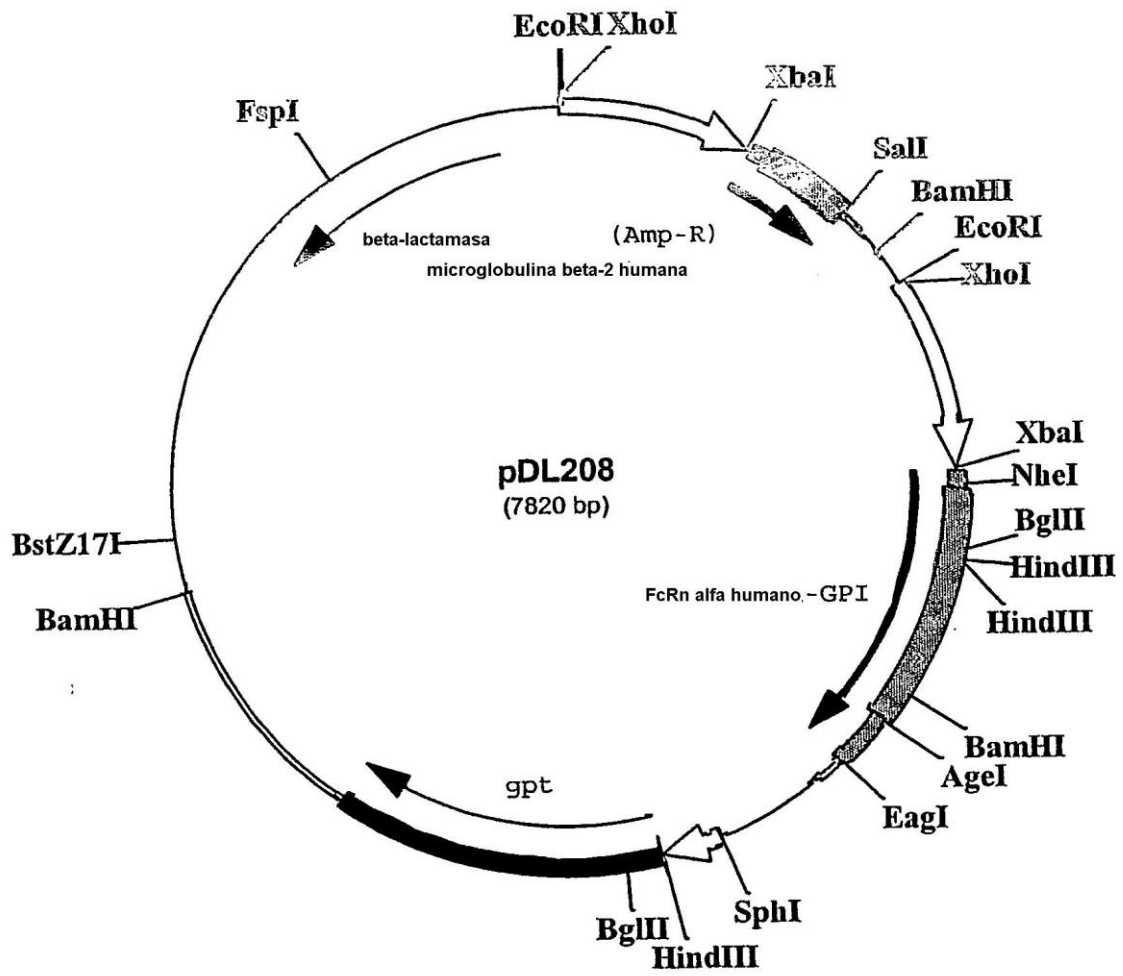


FIG. 9A

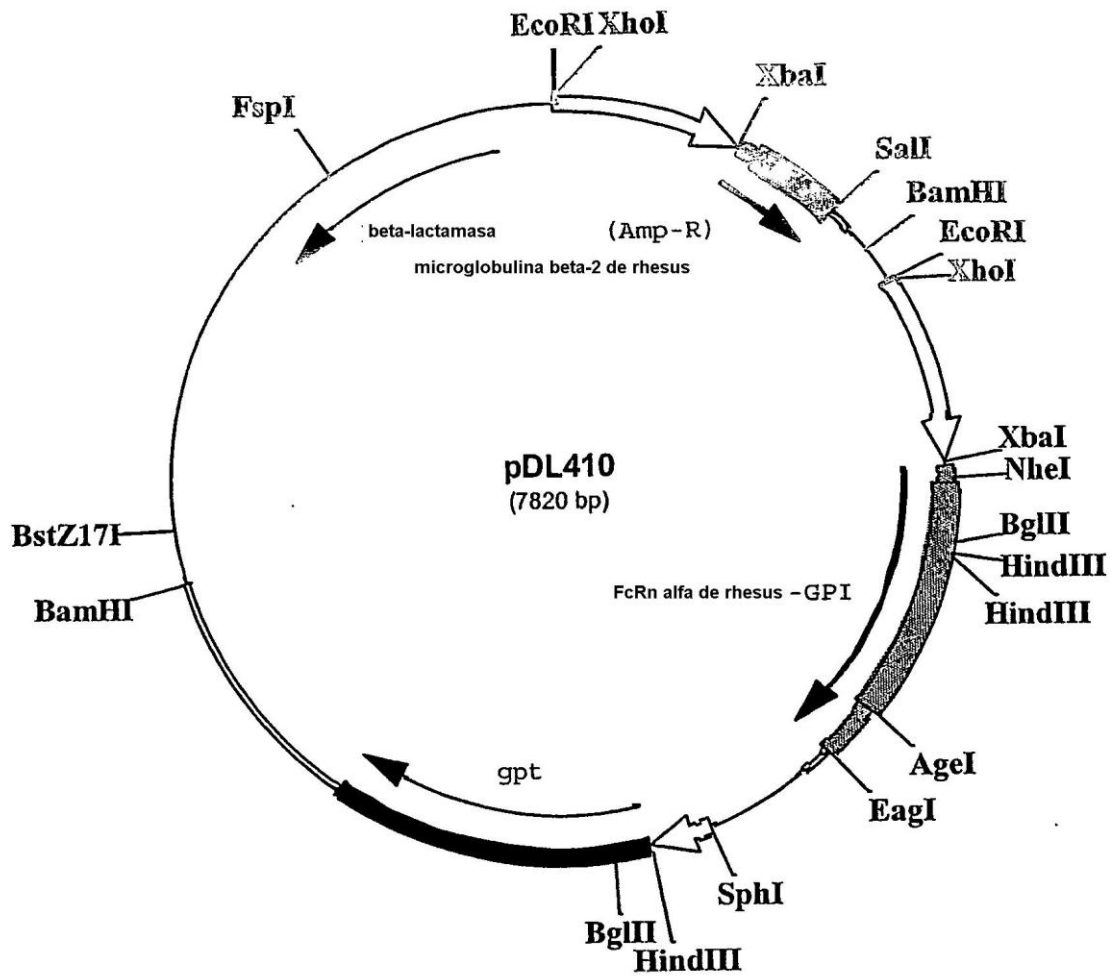


FIG. 9B

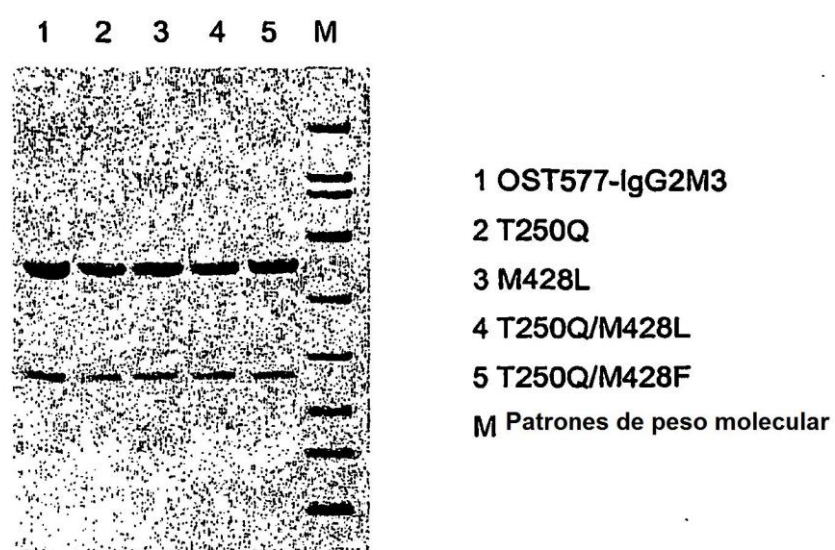


FIG. 10A

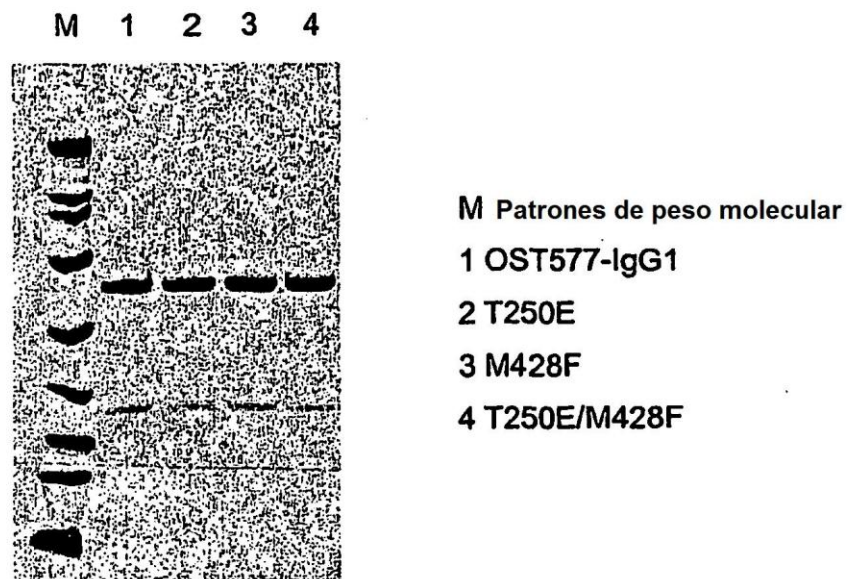


FIG. 10B

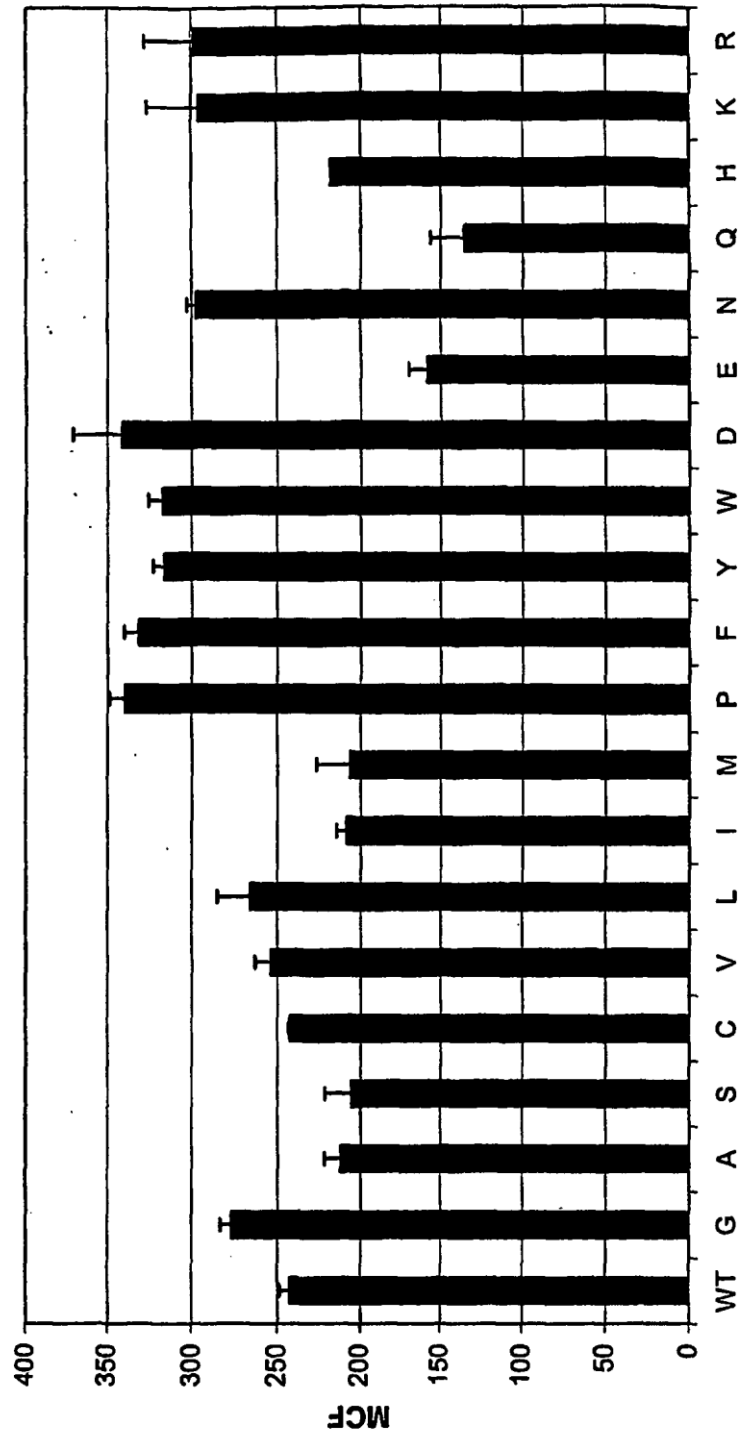


FIG. 11A

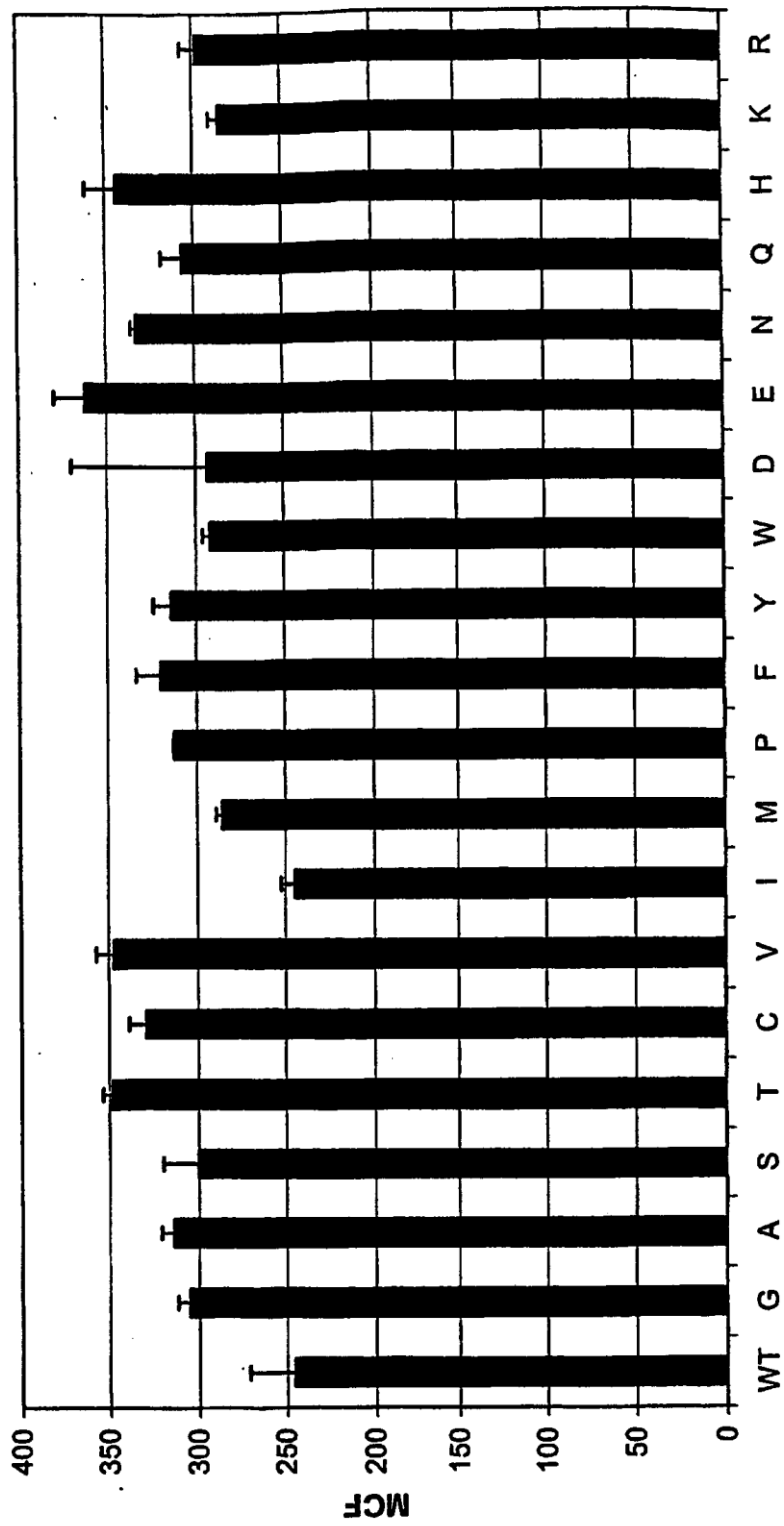


FIG. 11B

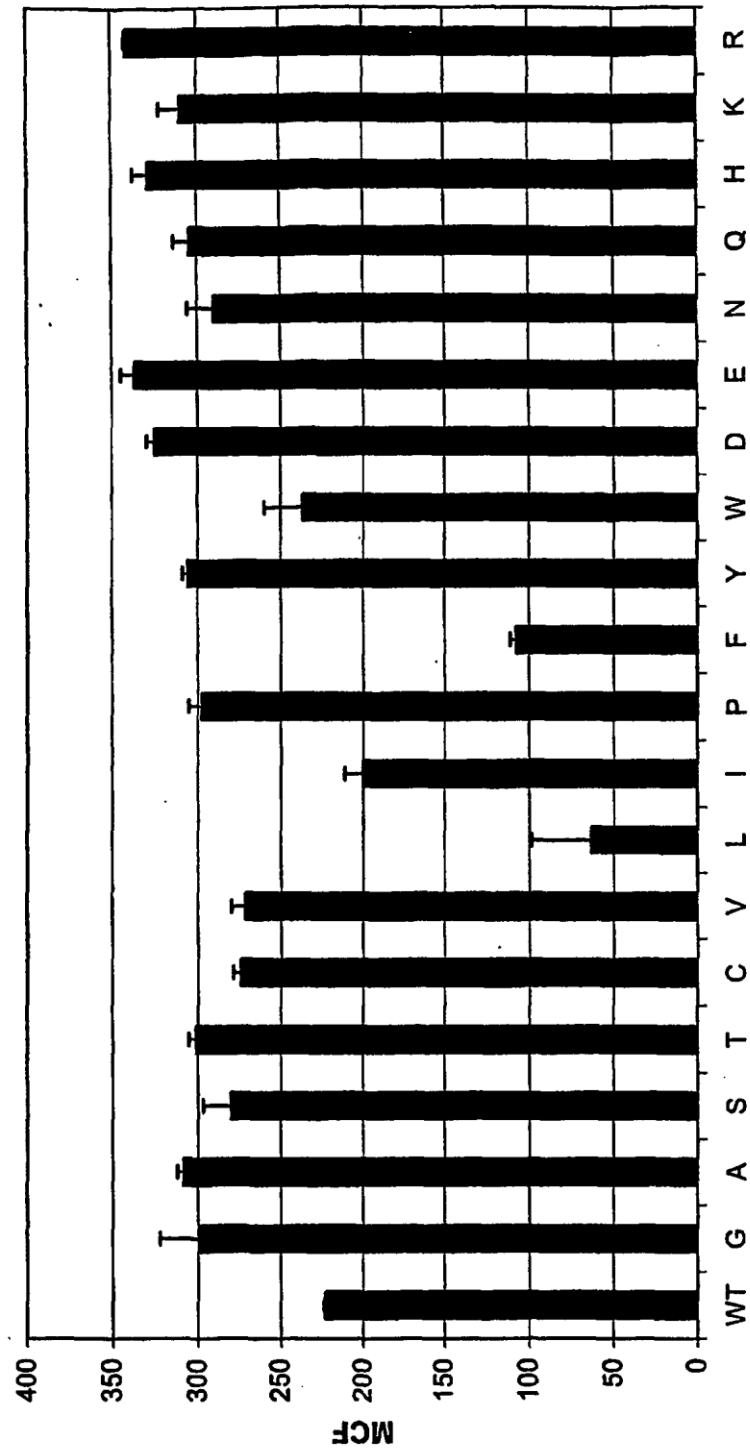


FIG. 11C

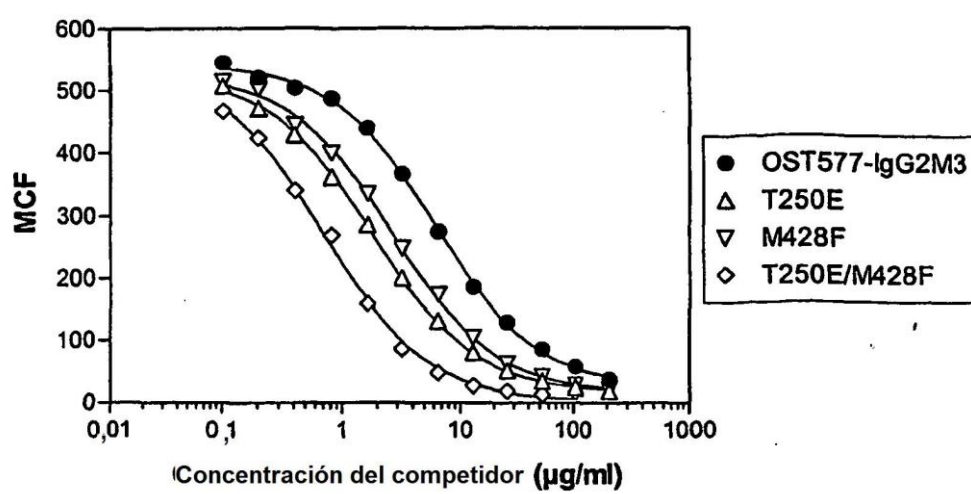


FIG. 12A

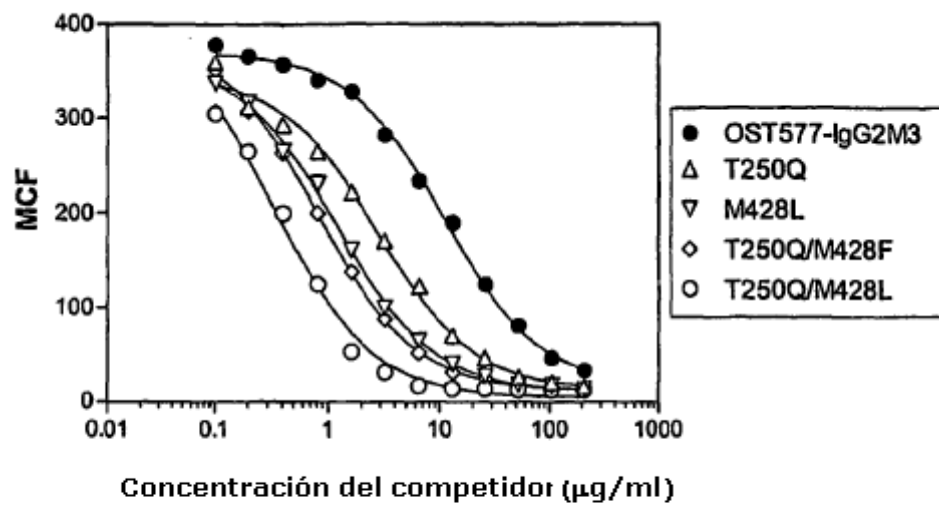


Fig 12B

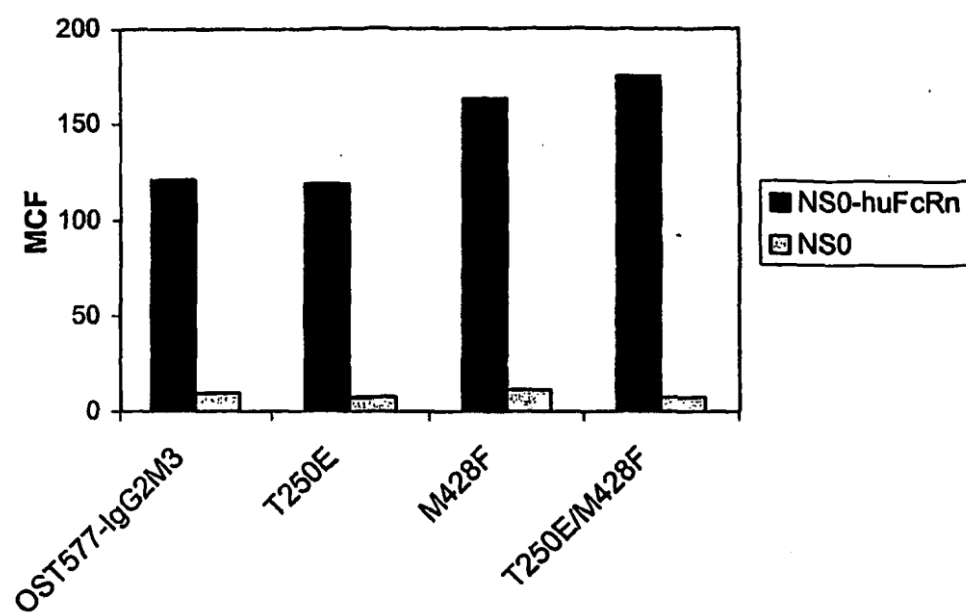


FIG. 13

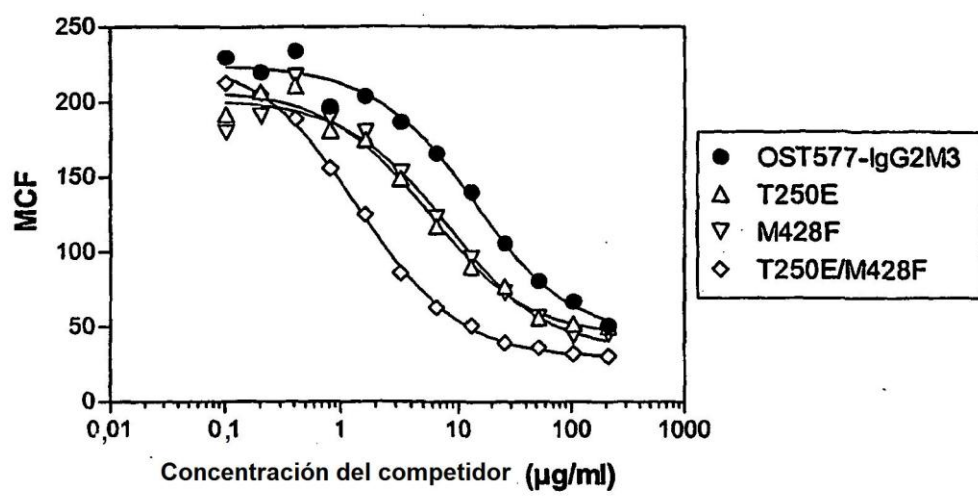


FIG. 14

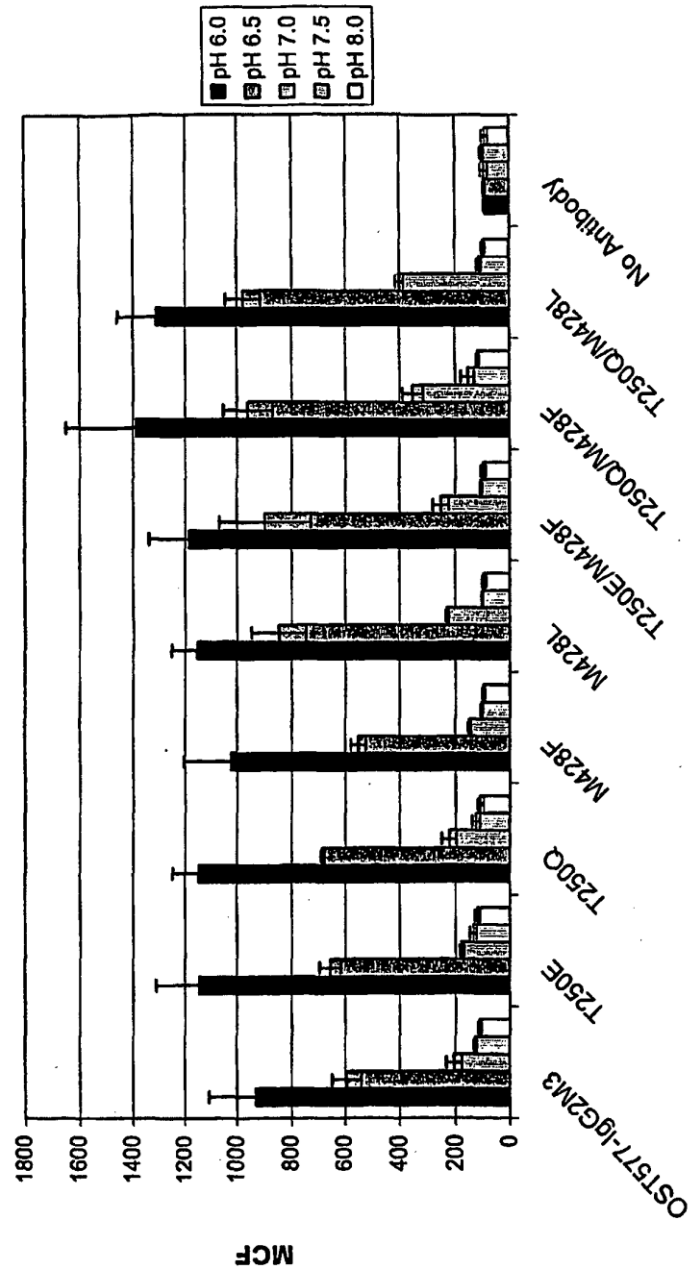


FIG. 15A

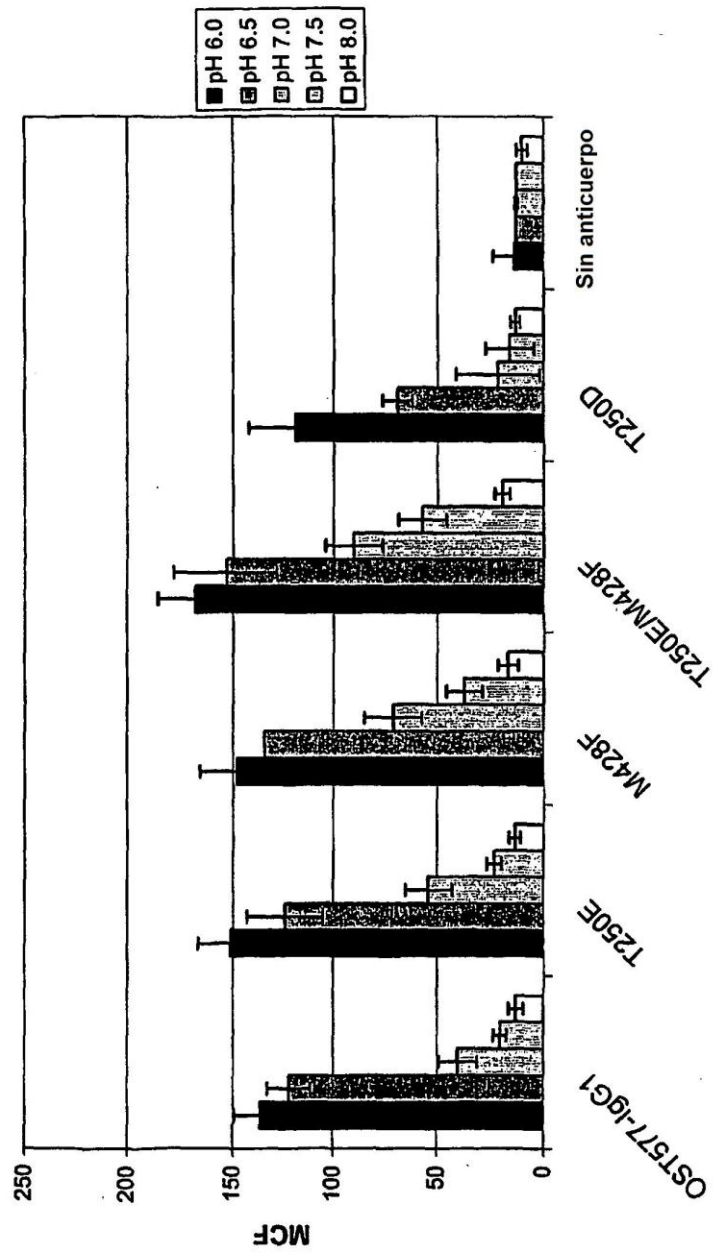


FIG. 15B

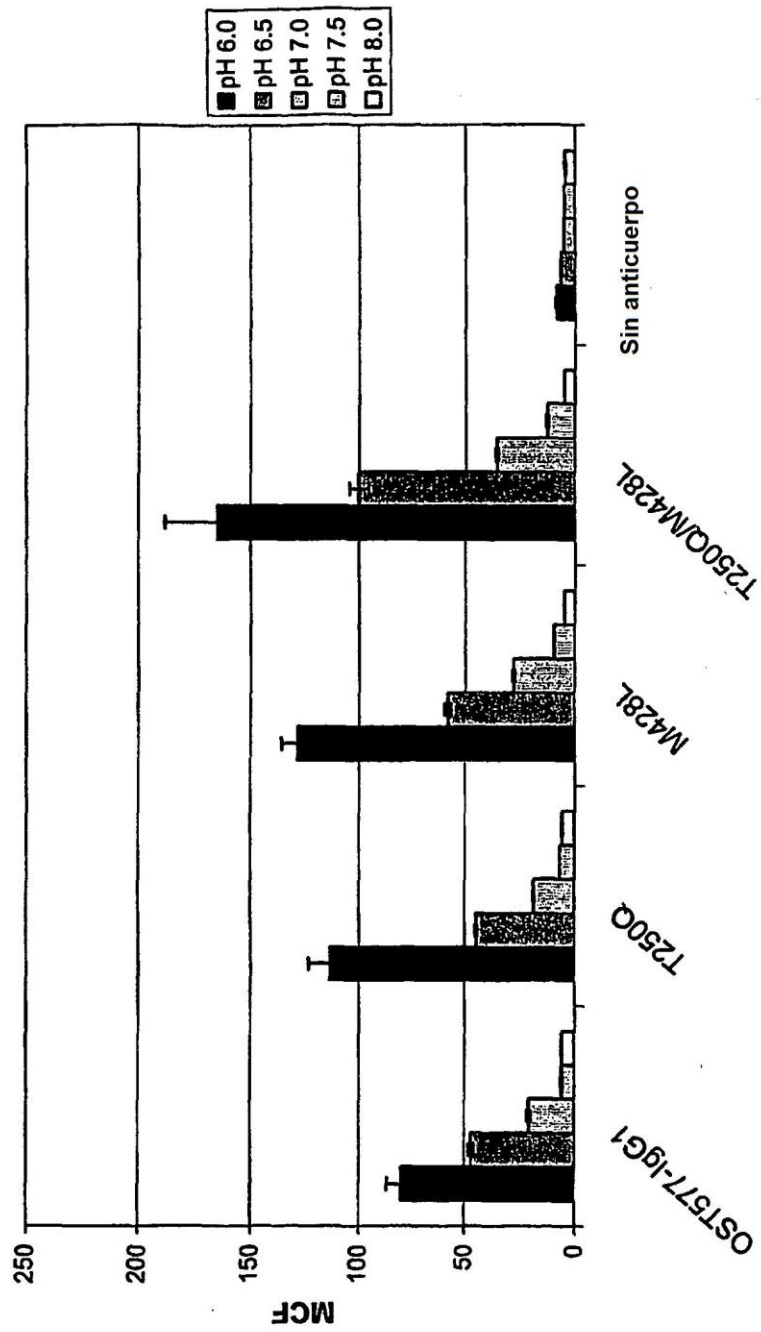


FIG. 15C

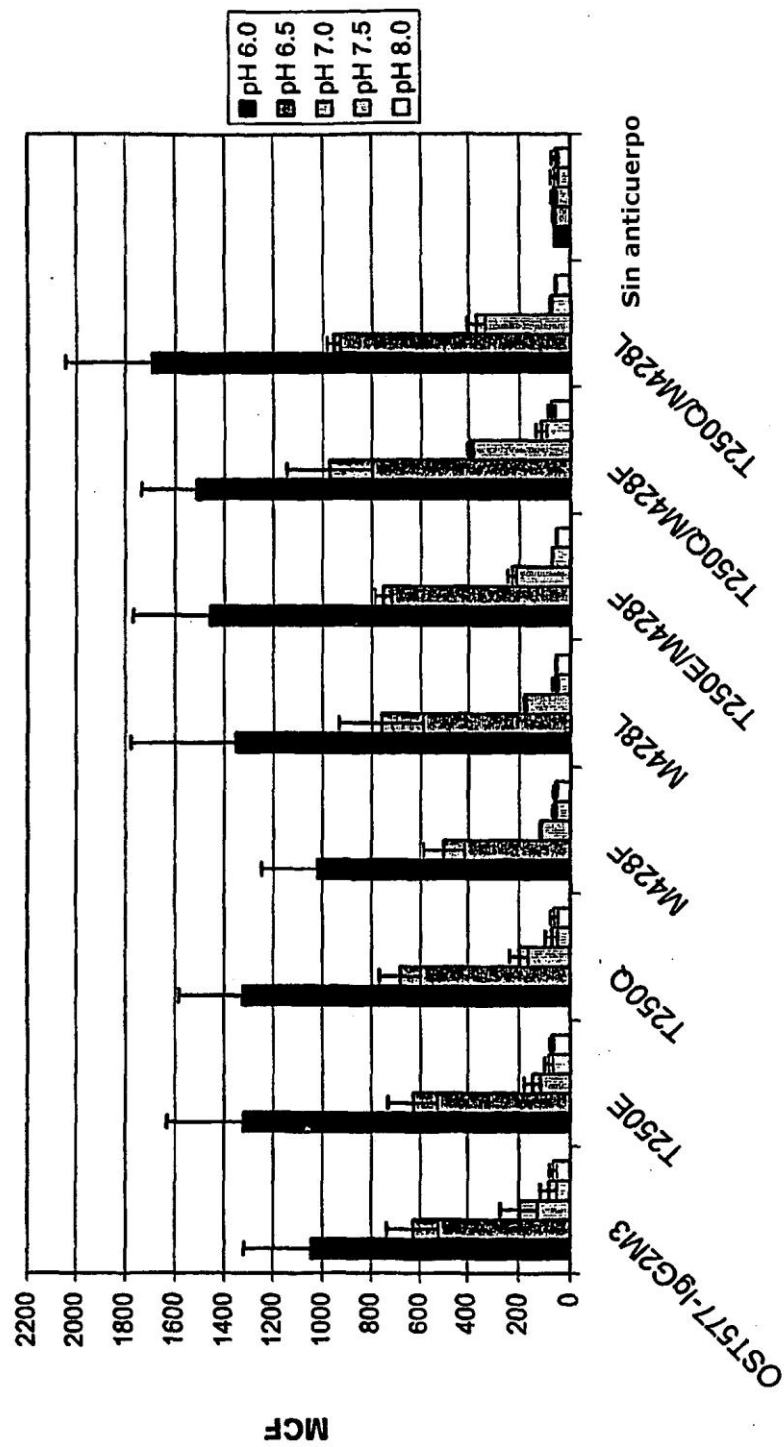


FIG. 15D

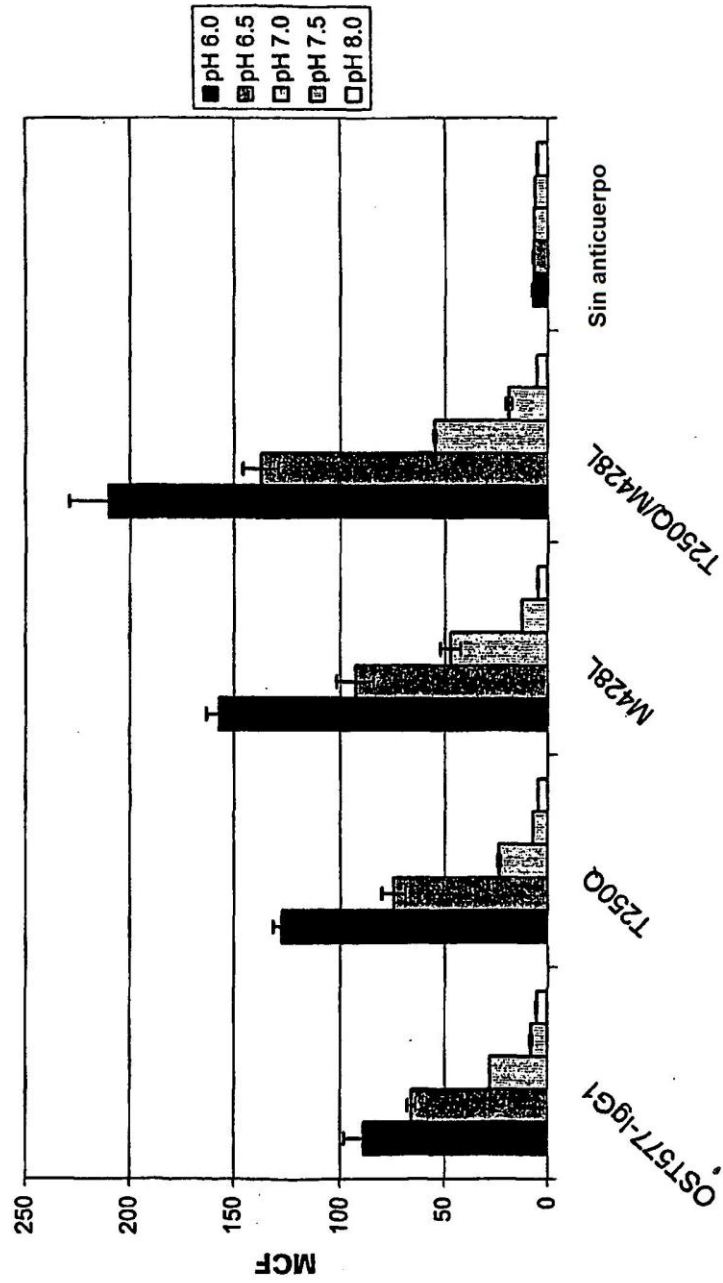


FIG. 15E

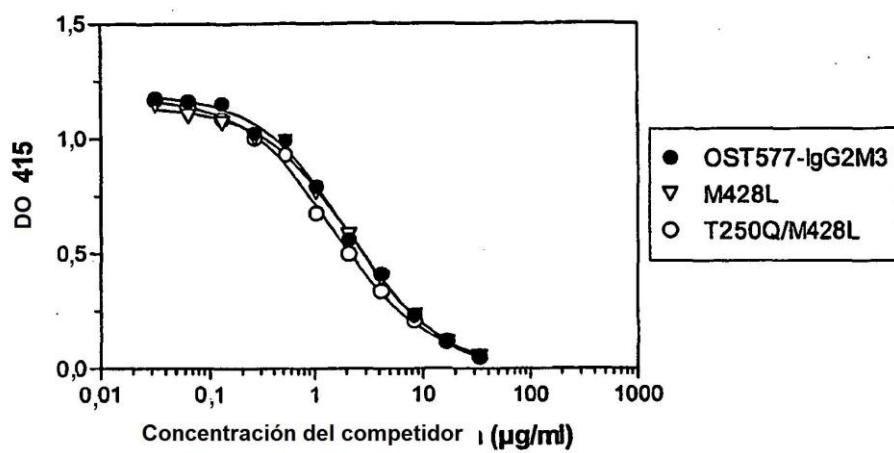


FIG. 16A

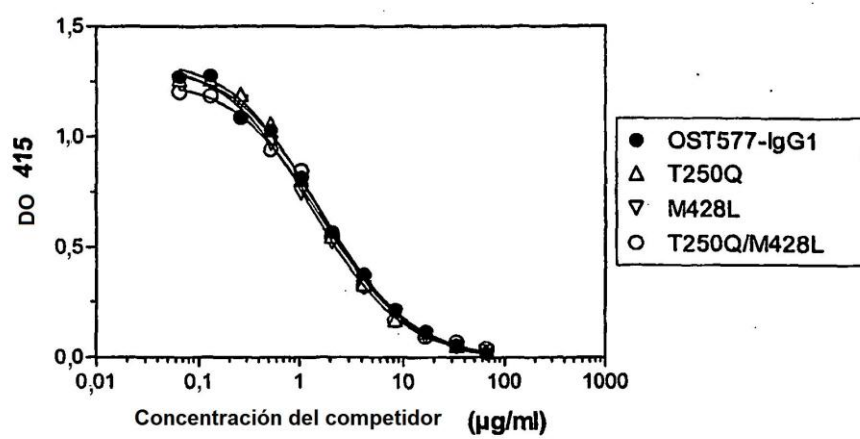


FIG. 16B

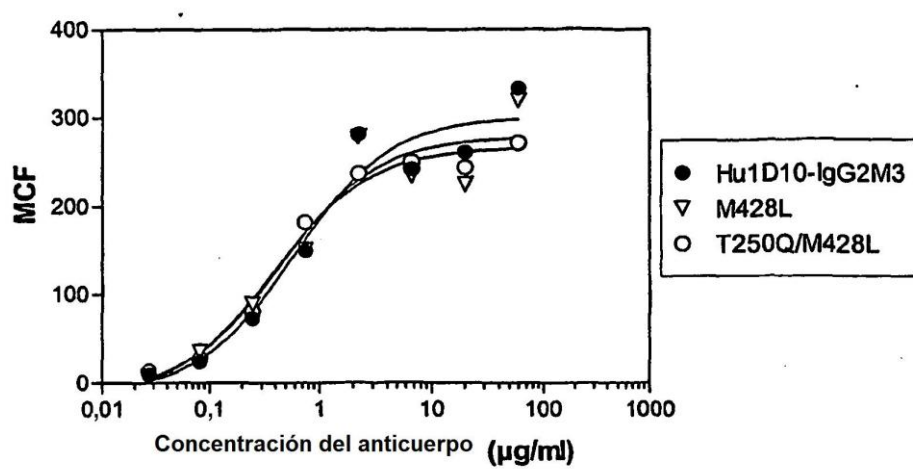


FIG. 17A

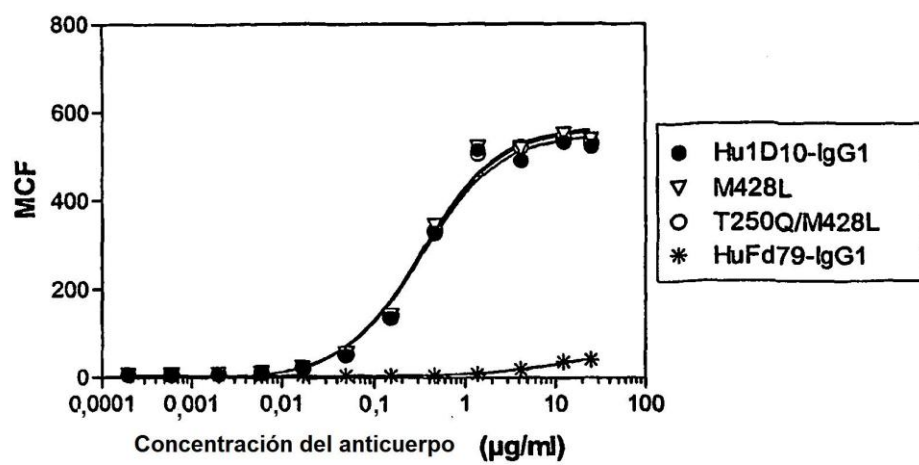


FIG. 17B

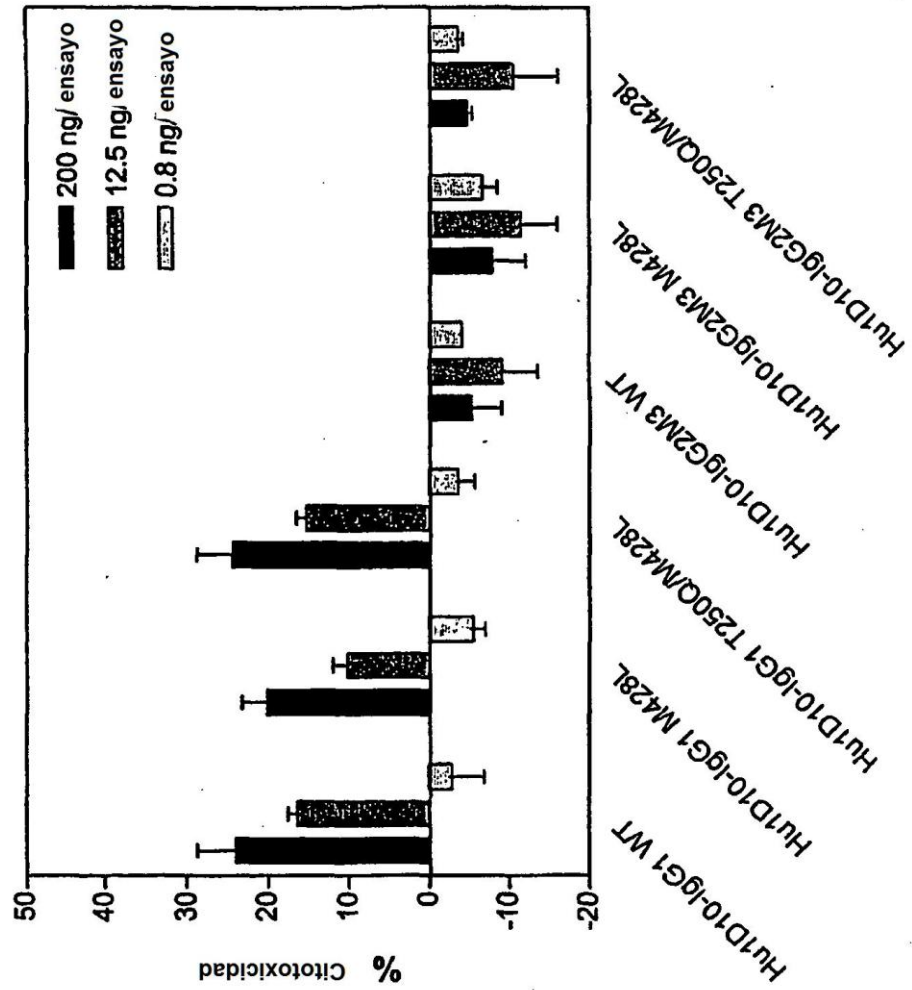


FIG. 18A

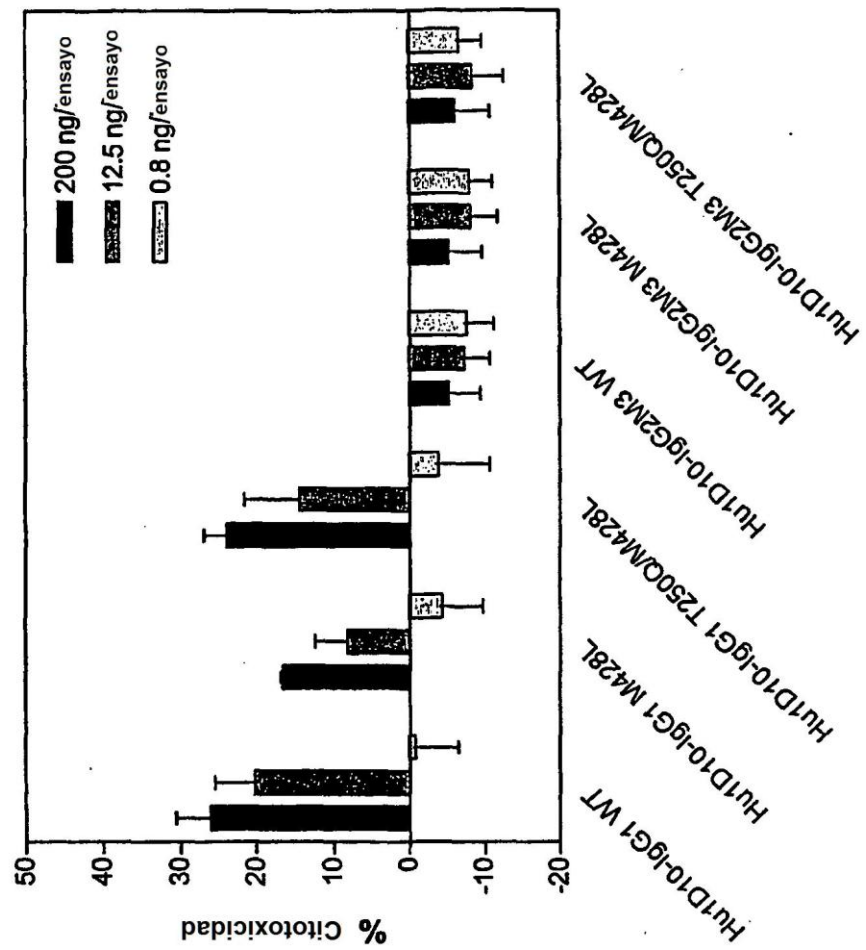


FIG. 18B

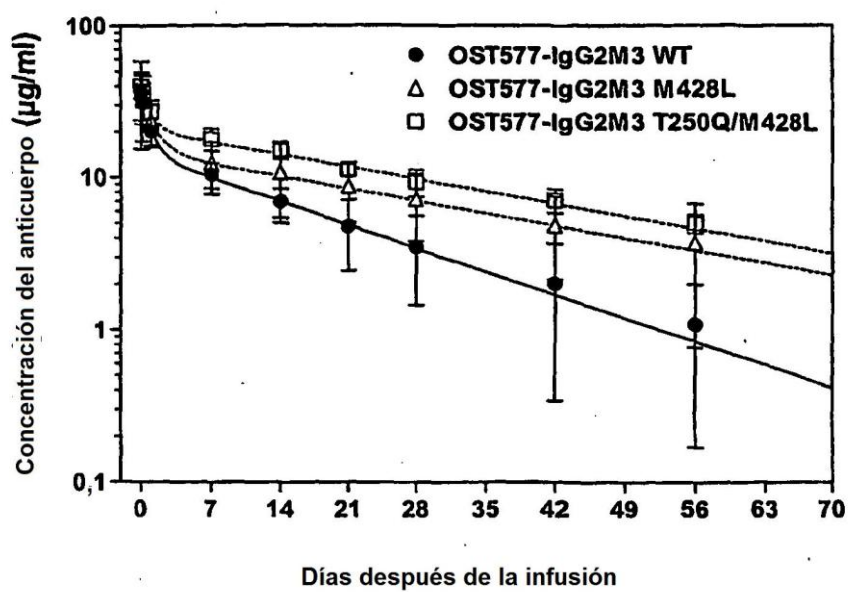


FIG. 19

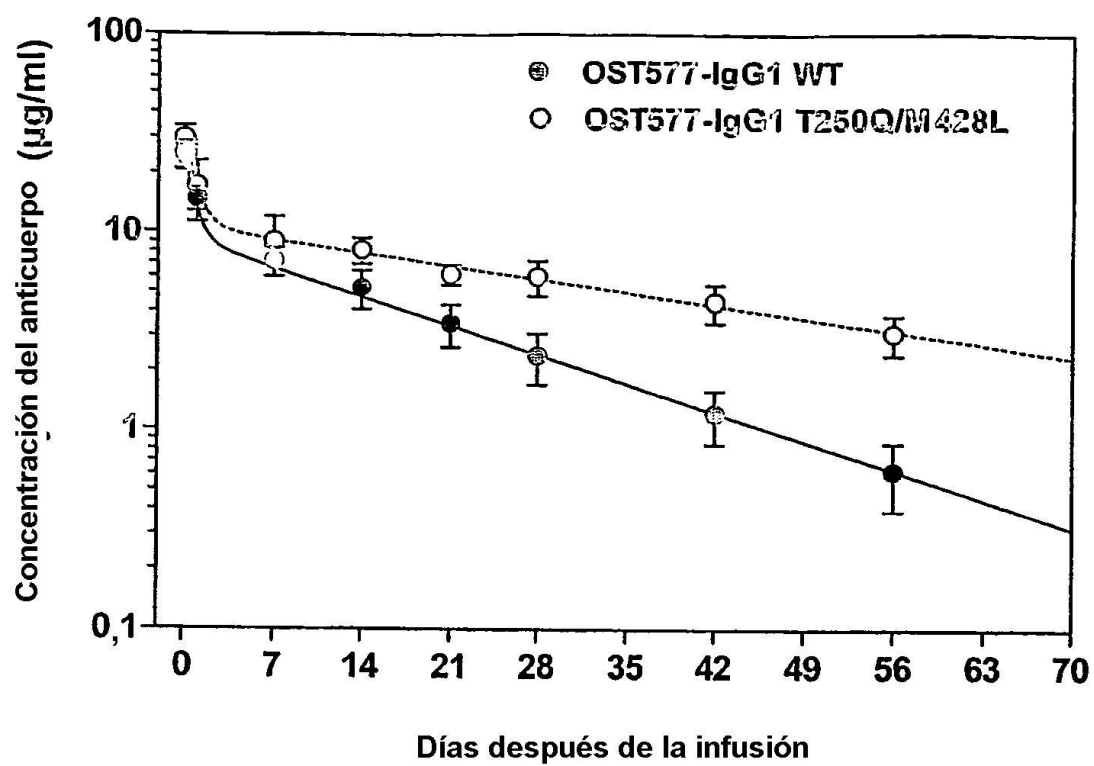


FIG. 20

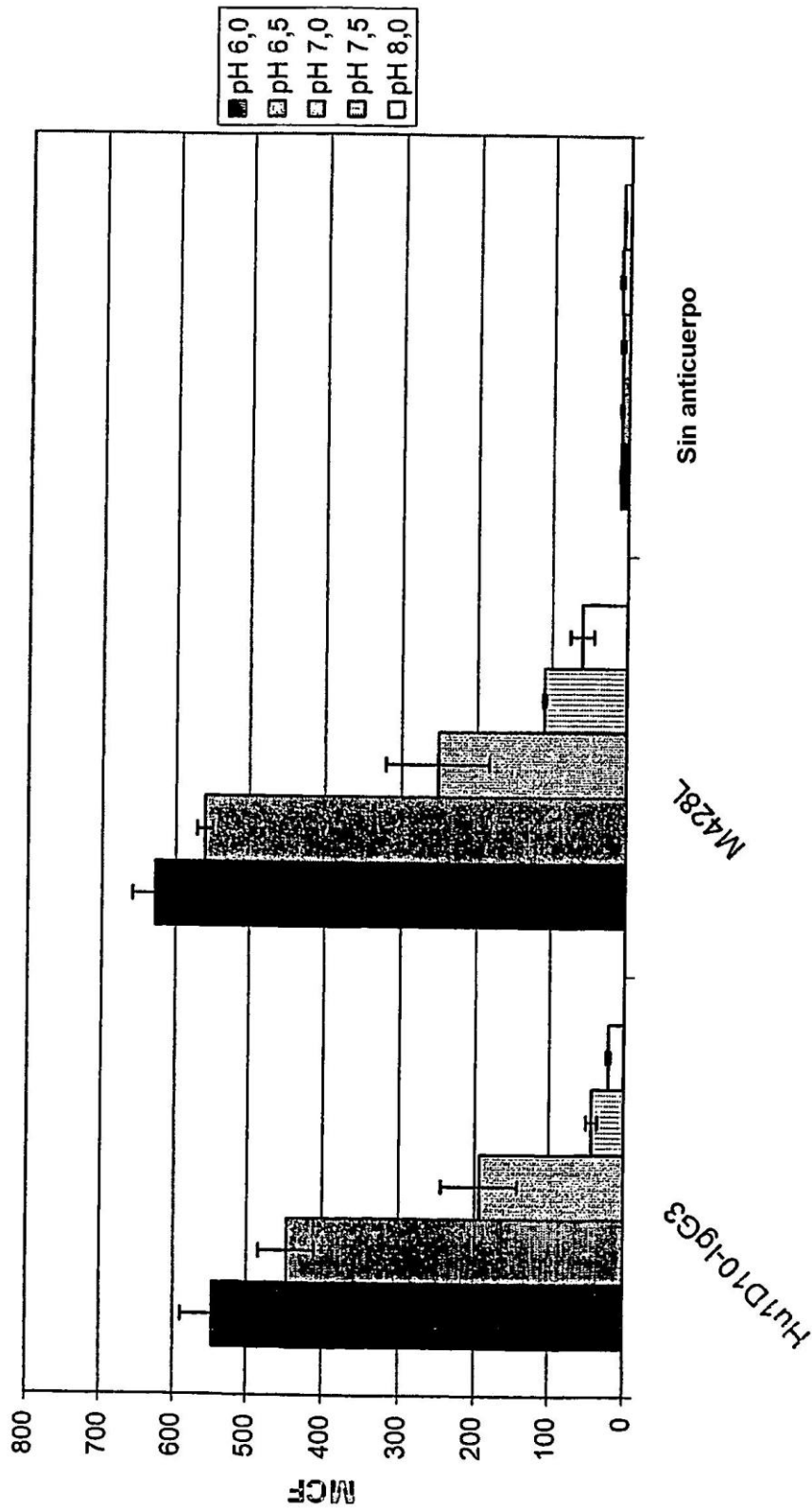


FIG. 21A

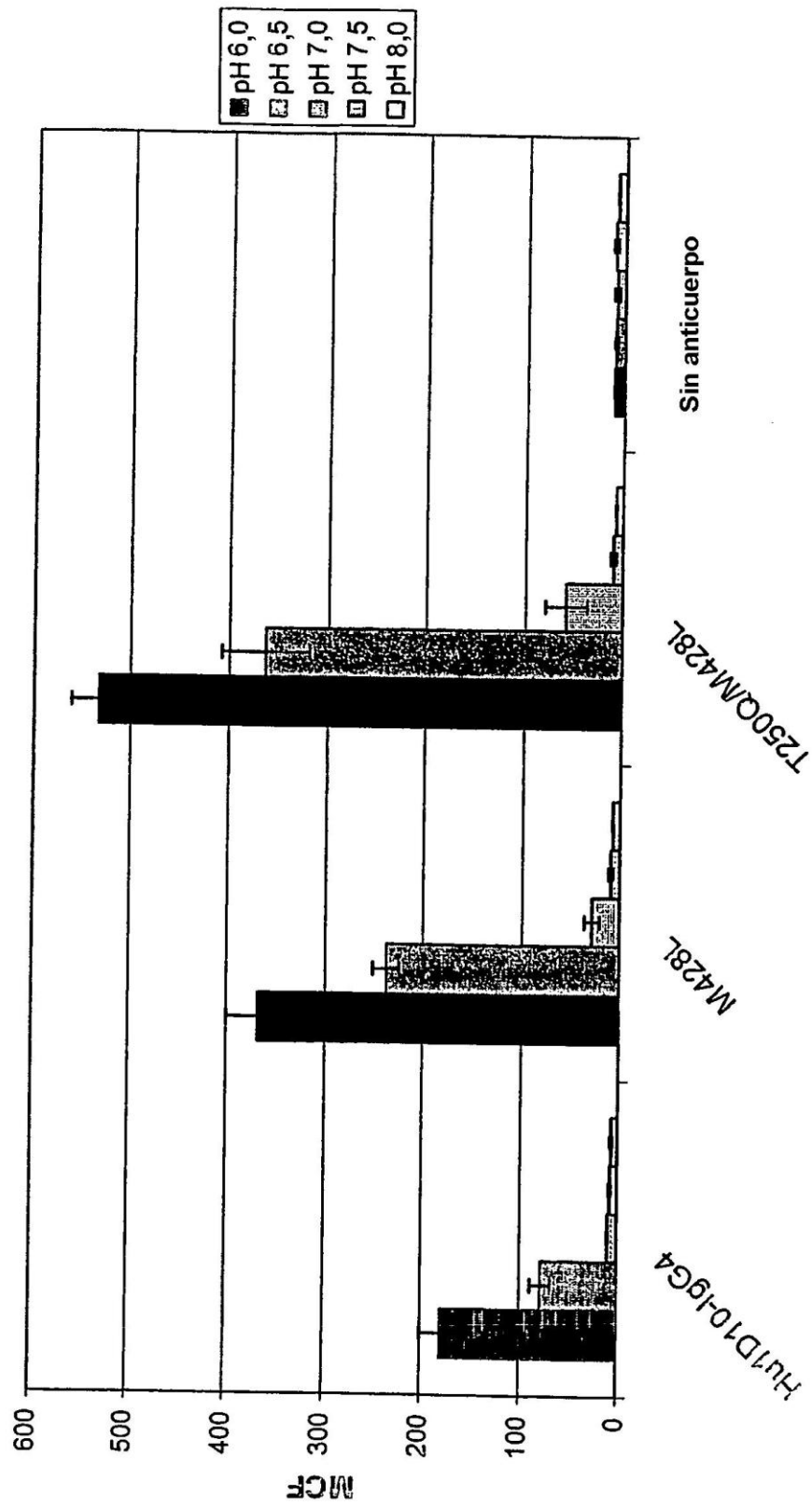


FIG. 21B

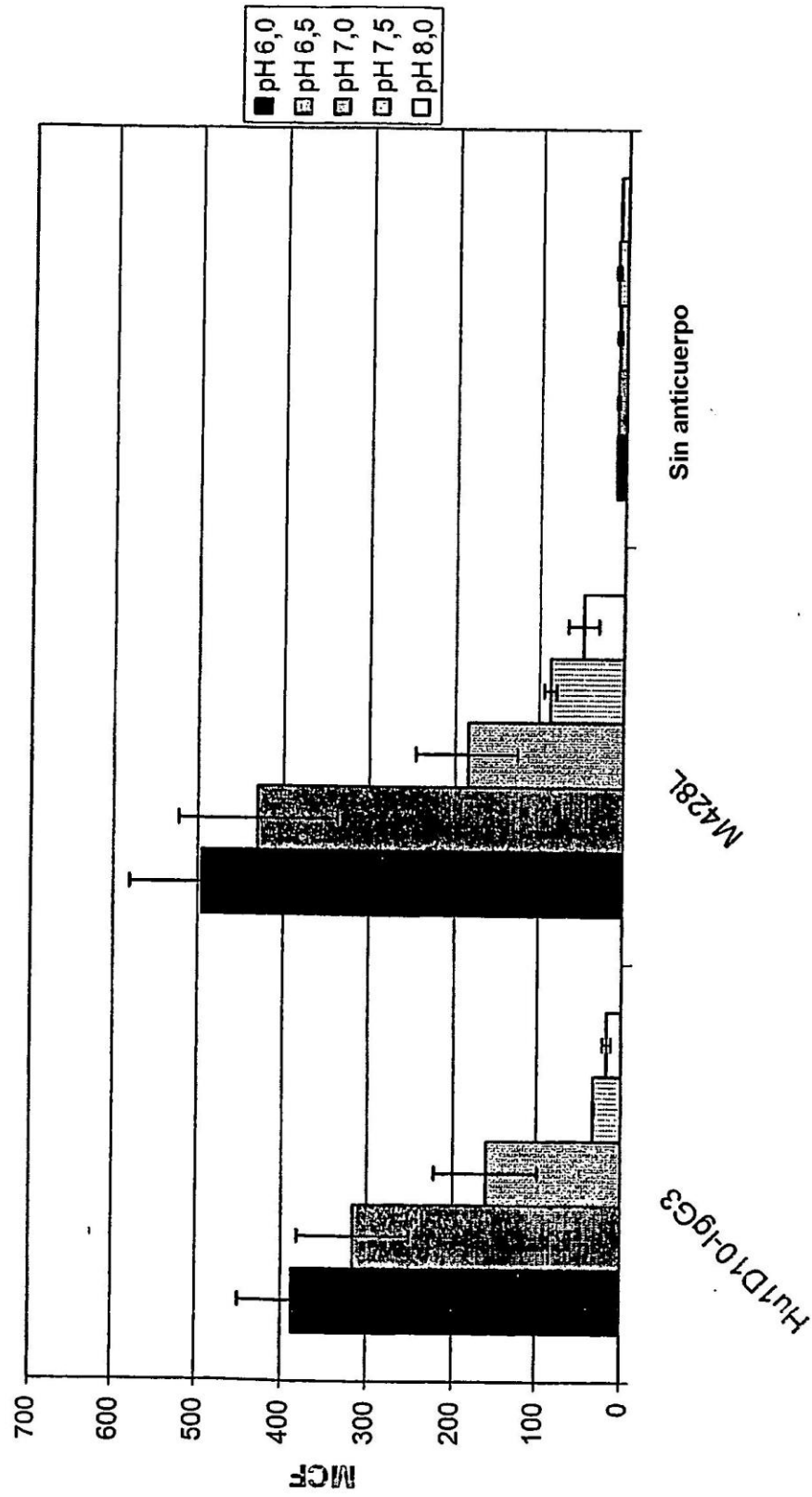


FIG. 21C



FIG. 21D

Daclizumab

Cadena ligera kappa madura (SEC ID N° 118)

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCSASSSISYMHWYQQKPKAPKLLIYTTSNLASGVPARFSGSGSGTEFTLTISSLQP
DDFATYYCHQRSTYPLTFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada gamma-1 madura con T250D (SEC ID N° 119)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q (SEC ID N° 120)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con M428L (SEC ID N° 121)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q/M428L (SEC ID N° 122)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q/M428F (SEC ID N° 123)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGGGVFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
SVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVFHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 22

Daclizumab (continuación)**Cadena pesada gamma-2M3 madura con r250D (SEC ID N° 124)**

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
 YMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAPSVFL
 FPPKPKDDLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT TVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q (SEC ID N°125)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
 YMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAPSVFL
 FPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT TVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con M428L (SEC ID N°126)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
 YMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAPSVFL
 FPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT TVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV LHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q/M428L (SEC ID N°127)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
 YMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAPSVFL
 FPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT TVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV LHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q/M428F (SEC ID N°128)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTSYRMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSTGYTEYNQKFKDKATITADESTNTA
 YMELSSLRSEDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAPSVFL
 FPPKPKDQLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLT TVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNGKGLPAPI EKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV FHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 22 (cont.)

Cadena pesada gamma-1 madura con T250D (SEC ID N°

Fontolizumab (HuZAF®)

Cadena ligera kappa madura (SEC ID N° 129)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASENVDITYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTITSSIQ
PDDFATYYCGQSYNYPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVPFIAPPSEQLKSECTASVCLLNHFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada gamma-1 madura con T250D (SEC ID N° 130)

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYIFTSSWINWVKQAPGQGLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGFLPWADWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q (SEC ID N° 131)

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYIFTSSWINWVKQAPGQGLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGFLPWADWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con M428L (SEC ID N° 132)

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYIFTSSWINWVKQAPGQGLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGFLPWADWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q/M428L (SEC ID N° 133)

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYIFTSSWINWVKQAPGQGLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGFLPWADWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Cadena pesada gamma-1 madura con T250Q/M428F (SEC ID N° 134)

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSKASGYIFTSSWINWVKQAPGQGLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTA
YMESSLRSEDYAVYYCARGFLPWADWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fig. 23

Visilizumab (Nuvion®)

Cadena ligera kappa madura (SEC ID N° 135)

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASSSVSYMNWYQQKPKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE
EDFATYYCQQWSSNPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T350D (SEC ID N° 136)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTA
YMEISSLRSEDTAVYYCARSAAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAP
SVFLFPPKPKDDLMI¹SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN²AKTKPREEQFNSTFRVVS³VLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC⁴SVMEALHNHYTQKSLSLSPSK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q (SEC ID N° 137)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTA
YMEISSLRSEDTAVYYCARSAAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAP
SVFLFPPKPKDQ¹LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN²AKTKPREEQFNSTFRVVS³VLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC⁴SVMEALHNHYTQKSLSLSPSK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con M428L (SEC ID N° 138)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTA
YMEISSLRSEDTAVYYCARSAAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAP
SVFLFPPKPKDQ¹LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN²AKTKPREEQFNSTFRVVS³VLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC⁴SVLHEALHNHYTQKSLSLSPSK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q/M428L (SEC ID N° 139)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTA
YMEISSLRSEDTAVYYCARSAAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAP
SVFLFPPKPKDQ¹LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN²AKTKPREEQFNSTFRVVS³VLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC⁴SVLHEALHNHYTQKSLSLSPSK

Cadena pesada gamma-2M3 madura con T250Q/M428F (SEC ID N° 140)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTA
YMEISSLRSEDTAVYYCARSAAYDYDGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCPAPPAAP
SVFLFPPKPKDQ¹LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN²AKTKPREEQFNSTFRVVS³VLTVVHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC⁴SVFHEALHNHYTQKSLSLSPSK

Fig. 24

M200**Cadena ligera kappa madura (SEC ID N° 141)**

QIVLTQSPAIMASLGERVTMTCTASSSVSSNYLHWYQQKPGSAPNLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM
EAEDAATYYCHQYLRSPPTFGGCTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLMNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada gamma-4 madura con T250D (SEC ID N° 142)

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTISGFSLTLDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNKSQVF
LIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMYTTGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadena pesada gamma-4 madura con T250Q (SEC ID N° 143)

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTISGFSLTLDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNKSQVF
LIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMYTTGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadena pesada gamma-4 madura con M428L (SEC ID N° 144)

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTISGFSLTLDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNKSQVF
LIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMYTTGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadena pesada gamma-4 madura con T250Q/M428L (SEC ID N° 145)

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTISGFSLTLDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNKSQVF
LIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMYTTGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Cadena pesada gamma-4 madura con T250Q/M428F (SEC ID N° 146) :

QVQLKESGPGLVAPSQSLISITCTISGFSLTLDYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSSTYNSALKSRMTIRKDNKSQVF
LIMNSLQTDSDAMYCARHGTYGMYTTGDALDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPE
FLGGPSVFLFPPKPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fig. 25