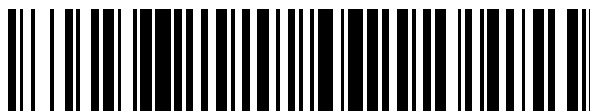


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 816**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2005 E 05773014 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 1776384**

54 Título: **Regiones Fc variantes**

30 Prioridad:

04.08.2004 US 598855 P

19.08.2004 US 602953 P

25.08.2004 US 604339 P

10.09.2004 US 609101 P

23.12.2004 US 638442 P

13.01.2005 US 643718 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.10.2013

73 Titular/es:

MENTRIK BIOTECH, LLC (100.0%)
Churchill Tower 12400 Coit Road, Suite 570
Dallas, TX 75251, US

72 Inventor/es:

ALLAN, BARRETT;
JIANG, WEIDONG;
TANG, YING y
WATKINS, JEFFRY DEAN

74 Agente/Representante:

PERAL CERDÁ, David

ES 2 426 816 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**REGIONES Fc VARIANTES**5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere a polipéptidos que comprenden una región Fc variante, novedosa. Específicamente, una región Fc variante, novedosa de la presente invención comprende al menos una sustitución de aminoácido descrita en el
10 presente documento que confiere una función efectora alterada o semivida sérica alterada a una inmunoglobulina que comprende la región Fc variante en comparación con la inmunoglobulina original que carece de esa sustitución de aminoácido. Además, la descripción proporciona un método para alterar una función efectora de un anticuerpo monoclonal o extender la semivida sérica de un polipéptido al
15 que se le une operativamente una región Fc variante de la invención. Se dan a conocer usos terapéuticos de polipéptidos, proteínas, particularmente anticuerpos monoclonales, que comprenden una región Fc variante de la invención.

Antecedentes de la invención

20

Hay al menos diecisiete anticuerpos monoclonales aprobados actualmente en los Estados Unidos para su uso como productos terapéuticos en seres humanos. Adicionalmente, hay varios cientos de anticuerpos monoclonales en ensayos clínicos y miles en pruebas preclínicas para el tratamiento de diversas enfermedades o trastornos incluyendo, por ejemplo, rechazo de trasplantes, cáncer, enfermedades inflamatorias, septicemia, nefritis, enfermedad de Alzheimer, alergias, diabetes, enfermedades autoinmunitarias, artritis, esclerosis múltiple y enfermedades infecciosas. El campo terapéutico de los anticuerpos monoclonales está
25 posicionado para un rápido crecimiento en los próximos años. Tras las vacunas, los anticuerpos (o inmunoglobulinas, "Ig") constituyen el segundo tipo más común de agente biofarmacéutico que está sometándose a prueba clínicamente (Stockwin, L.H. *et al.* Biochemical Society Transactions, 31:433-436, 2003).

La ingeniería genética ha contribuido sustancialmente al crecimiento del campo de anticuerpos monoclonales terapéuticos. La eficacia de un posible anticuerpo monoclonal terapéutico variará a menudo con cambios modestos en la secuencia de proteína del anticuerpo. Un cambio de un único aminoácido en la región variable de un anticuerpo monoclonal tiene el potencial de alterar la afinidad con la que el anticuerpo se une al epítipo antigénico, así como propiedades del anticuerpo tales como la velocidad K_{on} o la velocidad K_{off} . Tales cambios de aminoácidos pueden determinar el éxito o el fracaso de un anticuerpo monoclonal como agente terapéutico. De manera similar, cambios modestos en la secuencia de aminoácidos de la región Fc de un anticuerpo monoclonal pueden producir cambios profundos en las propiedades de función efectora del anticuerpo o la semivida de una proteína a la que está unida operativamente la región Fc.

La región Fc de un anticuerpo (es decir, los extremos carboxilo terminales de las cadenas pesadas de un anticuerpo que abarcan los dominios CH2, CH3 y una parte de la región bisagra (véase la figura 1)), tiene una variabilidad limitada y participa en efectuar los papeles fisiológicos desempeñados por el anticuerpo. Las funciones efectoras atribuibles a la región Fc de un anticuerpo varían con la clase y subclase de anticuerpo e incluyen (i) unión del anticuerpo mediante la región Fc a un receptor de Fc específico ("FcR") sobre una célula que desencadena diversas respuestas biológicas incluyendo, por ejemplo, fagocitosis y destrucción de partículas recubiertas con anticuerpos, aclaramiento de complejos inmunitarios, liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria del anticuerpo y control de la producción de inmunoglobulinas, (ii) citotoxicidad dependiente del complemento ("CDC") en la que la región Fc se une al componente C1q del complemento e inicia de ese modo la ruta clásica de activación del complemento que conduce a la lisis de la diana, (iii) citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos ("ADCC") en la que determinadas células del sistema inmunitario humano, por ejemplo fagocitos y células NK, mediante un receptor $Fc\gamma$, se unen a la región Fc de un anticuerpo mediante receptores de unión a anticuerpos específicos sobre las células inmunitarias y posteriormente señalizan la destrucción de la entidad a la que el anticuerpo está unido y (iv) unión a mastocitos, basófilos y eosinófilos. La afinidad con la que una región Fc puede unirse a un FcR particular (por ejemplo, $FcRn$), o el nivel con el que una región Fc puede mediar en la activi-

dad de CDC o ADCC son factores importantes para determinar la eficacia y semivida de proteínas terapéuticas, particularmente anticuerpos monoclonales.

La modificación particularizada de aminoácidos en la región Fc de IgG humana es
5 un área activa de estudio que produce información sobre la relación estructura-función relevante para el desarrollo de proteínas terapéuticas, particularmente anticuerpos monoclonales (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 6.165.745 y la publicación PCT n.º WO2004/035752 referentes a la alteración de la semivida sérica de un polipéptido operativamente unido a una región Fc y la pa-
10 tente estadounidense 6.737.056 y la publicación PCT n.º WO2004/029207 referentes a la alteración de una función efectora de un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc modificada).

El desarrollo de proteínas terapéuticas novedosas, particularmente anticuerpos
15 monoclonales, se beneficiaría de la capacidad para diseñar racionalmente una región Fc con modificaciones de aminoácidos particulares que confieren una propiedad beneficiosa deseada al anticuerpo de interés. No se esperaría que todos los anticuerpos monoclonales mejorasen como agente terapéutico debido a la misma modificación de aminoácido particular en la región Fc. Un anticuerpo mo-
20 noclal terapéutico que se une a un antígeno diana puede beneficiarse de un aumento en una función efectora particular mientras que un anticuerpo monoclonal terapéutico diferente que se une a un antígeno diana diferente puede beneficiarse de un aumento en una función efectora diferente, o incluso una disminución. Un anticuerpo monoclonal terapéutico puede beneficiarse de la capacidad
25 para unirse a un receptor de Fc particular con mayor afinidad mientras que otro anticuerpo puede mejorar como agente terapéutico uniéndose a ese receptor de Fc a una afinidad inferior y por tanto aclarándose del cuerpo a una velocidad más rápida. Además, una sustitución o modificación de aminoácido en una región Fc particular y que da como resultado un efecto que beneficiaría a un anticuerpo te-
30 rapéutico puede depender de la diana antigénica a la que se une el anticuerpo y/o la enfermedad o el trastorno que va a mejorarse por el anticuerpo.

Son necesarios métodos y composiciones que alteran funciones efectoras particulares asociadas con la región Fc de un anticuerpo para mejorar las propiedades

de anticuerpos terapéuticos existentes así como para generar anticuerpos terapéuticos novedosos con propiedades deseadas. Pueden usarse anticuerpos monoclonales con regiones Fc variantes para tratar diversas enfermedades o trastornos incluyendo, por ejemplo, trastornos inflamatorios, cáncer, trastornos autoinmunitarios, trastornos de señalización celular y enfermedades infecciosas. Adicionalmente, métodos y composiciones que alteran la semivida sérica de una proteína terapéutica, o bien aumentando la semivida y de ese modo permitiendo menos dosis o bien disminuyendo la semivida y de ese modo permitiendo un aclaramiento más rápido del cuerpo, beneficiarían la generación de anticuerpos terapéuticos así como otras proteínas terapéuticas.

Lo que se necesita con el fin de mejorar la eficacia de una proteína terapéutica, particularmente un anticuerpo monoclonal, son regiones Fc variantes con propiedades mejoradas.

15

Sumario de la invención

El alcance de la invención está limitado por las reivindicaciones.

La presente descripción proporciona regiones Fc variantes, es decir, regiones Fc que comprenden una sustitución de aminoácido descrita en el presente documento (por ejemplo, véase la tabla 1), que confieren propiedades beneficiosas a los polipéptidos que comprenden dichas regiones Fc variantes.

Las posiciones de Fc de una región Fc original en las que puede hacerse cualquier sustitución de aminoácido para generar una región Fc variante incluyen las posiciones 279, 341, 343 y 373 de la región Fc; en la que la numeración de los residuos, es decir, su número de posición, en la región Fc es la del índice de EU como en Kabat (véase la figura 2 en el presente documento). La presente descripción proporciona regiones Fc variantes que comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 279, 341, 343 ó 373 de una región Fc original, o cualquier combinación de las mismas. La región Fc original puede tener opcionalmente residuos de aminoácido no nativos en posiciones distintas de 279, 341, 343 y 373. Los residuos de aminoácido nativos en estas posiciones para IgG humana son valina (279), glicina (341), prolina (343) y tirosina (373).

En realizaciones preferidas a lo largo de la presente descripción, el residuo de aminoácido que sustituye al presente en la región Fc original es un residuo de aminoácido que se produce de manera natural. A menos que se indique lo contrario, la región Fc original puede ser una región Fc nativa o no nativa, preferiblemente de origen humano o sustancialmente de origen humano. La secuencia de aminoácidos de la región Fc original es preferiblemente la mostrada en SEQ ID NO: 1, 2, 3 ó 4. Preferiblemente, la región Fc original tiene un residuo de aminoácido nativo presente en la posición que va a sustituirse para generar una región Fc variante. Además, en todas partes, se entiende que una región Fc variante es una región Fc original modificada para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido tal como se describe en el presente documento. Adicionalmente, se entiende que una región Fc original puede ser una Fc de longitud completa o una parte de la misma que comprende el residuo de aminoácido que va a sustituirse para generar la región Fc variante.

La presente descripción proporciona además polipéptidos, preferiblemente anticuerpos monoclonales, que comprenden una región Fc variante (o un fragmento funcional de la misma) que comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición 279, 341, 343 ó 373 en comparación con la región Fc original. La región Fc variante que comprende al menos una sustitución de aminoácido en la posición de Fc 279, 341, 343 ó 373 puede comprender además al menos una sustitución de aminoácido adicional en la región Fc en comparación con el residuo de aminoácido presente en la región Fc nativa del mismo tipo que la región Fc variante.

En una realización, una región Fc variante (es decir, una variante de una región Fc original) comprende al menos 1, 2, 3 o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de las siguientes: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y,

257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H,
 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D,
 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T,
 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R,
 5 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L,
 293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R,
 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S,
 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N,
 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L,
 10 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D,
 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S,
 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L,
 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G,
 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W,
 15 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S,
 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R,
 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V,
 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I,
 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y,
 20 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H,
 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T,
 440V o 442K.

En una realización preferida, una región Fc variante comprende al menos 1, 2, 3 o
 25 más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de las siguientes: 235G, 236F,
 236R, 236Y, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W,
 238Y, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247T, 247W,
 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I,
 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P,
 30 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256W,
 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H,
 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272R, 279A, 279D, 279G,
 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283H, 283K, 283M,
 283R, 283W, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292G, 292I, 301W, 304E, 307E,

307M, 312P, 315F, 315L, 315P, 316F, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 5 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373W, 375R, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378D, 378N, 379N, 379Q, 379T, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382I, 382K, 382L, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 386K, 423N, 424H, 424M, 10 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 440D, 440I o 440L.

- 15 Las regiones Fc variantes se caracterizan preferiblemente usando uno o más de los métodos experimentales descritos en el presente documento. Tales regiones Fc variantes confieren una función efectora alterada o una semivida sérica alterada a un anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante o una semivida sérica alterada a un polipéptido al que la región Fc variante está operativa- 20 mente unida.

Preferiblemente, la región Fc original de una región Fc variante de la invención es una región Fc nativa o codificada por la línea germinal de origen humano seleccionada del grupo que consiste en IgG, IgA, IgE, IgM e IgD o una variante poli- 25 mórfica de la misma, o un fragmento funcional de la misma. Preferiblemente, la región Fc original es una región Fc de IgG, y más preferiblemente, una región Fc de IgG1, IgG3 o IgG4. La región Fc original puede comprender opcionalmente una o más sustituciones de aminoácidos adicionales en comparación con la región Fc nativa, distintas de las ya descritas en el presente documento (es decir, las susti- 30 tuciones enumeradas en la tabla 1), particularmente una o más sustituciones de aminoácidos conocidas en la técnica o descritas en las patentes estadounidenses 6.165.745 o 6.737.056; o las publicaciones PCT n.^{os} WO2004/035752 o WO2004/029207; tal(es) sustitución/sustituciones de aminoácidos, si está(n) presente(s) en la región Fc original, entonces estarían también presentes en la región

Fc variante y en un polipéptido que comprende una región Fc variante, a menos que esté en una posición posteriormente sustituida para generar la región Fc variante.

- 5 En una realización preferida, un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante es un anticuerpo quimérico. En una realización más preferida, un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano en el que la secuencia de entramado y la secuencia de región constante presentes en el anticuerpo son sustancialmente de
10 origen humano. El anticuerpo quimérico, humanizado o humano es preferiblemente un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo de cadena sencilla. Cuando un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante va a usarse como agente terapéutico en seres humanos, preferiblemente la región Fc es sustancialmente de origen humano.

15

- Preferiblemente, un polipéptido que comprende, o está operativamente unido a, una región Fc variante (es decir, "polipéptido variante") tiene al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc variante en comparación con la región Fc original, y presenta una función efectora alterada o semivida sérica alterada en
20 comparación con la del polipéptido que comprende la región Fc original de dicha región Fc variante, en el que la "al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc variante" es (i) cualquier sustitución de aminoácido en la posición 279, 341, 343 ó 373 de la región Fc o (ii) al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 235G, 235R, 236F, 236R, 236Y, 237K, 237N,
25 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 244L, 245R, 247A, 247D, 247E, 247F, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247T, 247W, 247Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256H, 256I, 256K, 256L, 256V, 256W, 256Y,
30 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 258D, 260S, 262L, 264S, 265K, 265S, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 271T, 272H, 272K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279F, 279G, 279H, 279I, 279K, 279L, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283P, 283R, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L,

293S, 293V, 301W, 304E, 307E, 307M, 312P, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316F, 316K, 317P, 317T, 318N, 318P, 318T, 332F, 332G, 332L, 332M, 332S, 332V, 332W, 339D, 339E, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339L, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343I, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373G, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376E, 376F, 376G, 376H, 376I, 376L, 376M, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 376W, 376Y, 377G, 377K, 377P, 378N, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380D, 380N, 380S, 380T, 382D, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382P, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 385E, 385P, 386K, 423N, 424H, 424M, 424V, 426D, 426L, 427N, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431K, 431P, 432R, 432S, 438G, 438K, 438L, 438T, 438W, 439E, 439H, 439Q, 440D, 440E, 440F, 440G, 440H, 440I, 440K, 440L, 440M, 440Q, 440T, 440V o 442K, o (iii) al menos dos sustituciones de aminoácidos enumeradas en (i) o (ii) anteriormente, o (iv) al menos 1, 2 ó 3 sustituciones de aminoácidos enumeradas en (i) o (ii) anteriormente además de al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc no enumerada en (i) o (ii) anteriormente. Preferiblemente, la función efectora alterada es un aumento en ADCC, una disminución en ADCC, un aumento en CDC, una disminución en CDC, un aumento en la afinidad de unión a C1q, una disminución en la afinidad de unión a C1q, un aumento en la afinidad de unión a FcR (preferiblemente FcRn) o una disminución en la afinidad de unión a FcR (preferiblemente FcRn) en comparación con dicho polipéptido que carece de la sustitución de aminoácido en la región Fc (es decir, región Fc original).

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 254F, 254M, 254Y, 256A, 258D, 279A, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N,

429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I o 440L, [preferiblemente 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I o 440L], presentando el
 5 anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante ADCC potenciada en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K,
 10 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, 254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K,
 15 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K,
 20 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R,
 25 432S, 434I, 440D, 440T, 440V o 442K, [preferiblemente 235R, 236F, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272N, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332K, 332R,
 30 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376A, 376W, 432R o 432S], presentando el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante actividad de ADCC disminuida en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K o 442K, [preferiblemente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L o 438W] presentando el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante afinidad de unión a FcRn potenciada en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I,

268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 5 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F o 440M, [preferiblemente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 10 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P o 432S], presentando el anticuerpo mono- 15 clonal que comprende la región Fc variante afinidad de unión a FcRn disminuida en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región 20 Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 25 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332L, 332M, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 30 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A,

376F, 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K, 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q o 440Y, [preferiblemente 236Y, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P, 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N, 339S, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373E, 373F, 373H, 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D, 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 434Y, 438L o 440Y] presentando el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante actividad de CDC potenciada en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

La descripción proporciona un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332E, 332M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M o 427N [preferiblemente 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N,

271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 378D, 385E, 423N o 424H] presentando el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante actividad de CDC disminuida en comparación con el anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original.

5

La descripción caracteriza además un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante de la invención, uniéndose dicho anticuerpo específicamente a un antígeno diana humano. Preferiblemente, el antígeno diana se selecciona del grupo que consiste en CD3, CD20, CD25, TNF α , Her2/neu, CD33, CD52, EGFR, EpCAM, MUC1, GD3, CEA, CA125, HLA-DR, TGF β , VEGF, GDF8, GDF11, grelina o cualquier precursor o fragmento funcional de los mismos.

La descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K o 442K, [preferiblemente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L o 438W], presentando el polipéptido variante

semivida sérica potenciada en comparación con el polipéptido original (es decir, un polipéptido idéntico al polipéptido variante pero que carece de la sustitución de aminoácido enumerada anteriormente en el presente documento).

- 5 La descripción proporciona un polipéptido variante que comprende una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en la región Fc: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 439Q, 440D, 440E, 440F o 440M [preferiblemente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341I, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P o 432S], presentando el polipéptido variante semivida sérica disminuida en comparación con el polipéptido original (es decir, un polipéptido idéntico al polipéptido variante pero que carece de la sustitución de aminoácido enumerada anteriormente en el presente documento).

30

En una realización la descripción proporciona un método para aumentar la actividad de ADCC de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico (o fragmento funcional del mismo), que comprende modificar por ingeniería genética un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que

codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 247A, 247F, 247H, 247I, 247L, 247M, 247T, 247V, 247Y, 249E, 249Y, 251F, 254F, 254M, 254Y, 256A, 256M, 258D, 268D, 268E, 279A, 280A, 280K, 283A, 283I, 283K, 283M, 283R, 288N, 292A, 311A, 311D, 311N, 311T, 311V, 311Y, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 330K, 332T, 332V, 339D, 339F, 339G, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 376A, 376V, 377G, 377K, 379N, 380N, 380S, 382A, 382I, 385E, 427N, 429M, 434W, 436I, 440G, 440H, 440I o 440L [preferiblemente 247A, 247F, 247M, 247T, 247V, 247Y, 254F, 254Y, 258D, 279A, 283M, 288N, 292A, 311D, 311N, 311T, 315L, 318N, 318P, 318T, 318V, 339D, 339I, 339K, 339M, 339N, 339Q, 339R, 339S, 376A, 376V, 377K, 379N, 380N, 382A, 440I o 440L]. La molécula de ácido nucleico que codifica para la región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente o bien mientras que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de Ig), o bien el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante (es decir, tras la introducción de al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente) a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la actividad de ADCC del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con actividad de ADCC mayor que la del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, potenciada, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La descripción caracteriza además

un anticuerpo monoclonal, o fragmento funcional del mismo, que comprende una región Fc variante producida mediante el método.

En una realización la descripción proporciona un método para disminuir la actividad de ADCC de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico (o fragmento funcional del mismo), que comprende modificar por ingeniería genética un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235Q, 235R, 235S, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247G, 247R, 249L, 249P, 250K, 250M, 250R, 251H, 251I, 251W, 252Y, 254L, 254P, S254Q, 254T, 254V, 256V, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 260S, 262L, 264S, 265H, 265K, 265S, 267G, S267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272H, 272K, 272L, 272N, 272R, 279D, 279F, 279K, 279L, 279W, 283D, 283F, 283G, 283H, 283L, 283T, 283W, 283Y, 285N, 288P, 292E, 292F, 292G, 292I, 293S, 293V, 301W, 304E, 307A, 307E, 307M, 311F, 311I, 311K, 311S, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 315F, 315P, 316F, 317P, 327T, 328V, 329Y, 332G, 332K, 332L, 332R, 332W, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343F, 343G, 343H, 343L, 343M, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343V, 343W, 343Y, 373A, 373D, 373E, 373F, 373G, 373I, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373S, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376E, 376F, 376G, 376H, 376W, 376Y, 379Q, 382D, 382S, 429A, 429F, 430H, 430K, 430N, 430Q, 430R, 430W, 432R, 432S, 434I, 440D, 440T, 440V o 442K [preferiblemente 235R, 236F, 236R, 236Y, 237E, 237K, 237N, 237R, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 247R, 249P, 250K, 251H, 254T, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 265H, 265K, 265S, 267G, 267H, 267I, 267K, 269N, 269Q, 270A, 270G, 270K, 270M, 270N, 271T, 272R, 288P, 292E, 301W, 304E, 316F, 317P, 327T, 329Y, 332K, 332R, 341F, 341I, 341M, 341P, 341Q, 341R, 341T, 341W, 341Y, 343W, 373A, 373E, 373G, 373S, 376W, 429A, 432R o 432S]. La molécula de ácido nucleico que codifica para la región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente o bien mientras que la

molécula de ácido nucleico está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de Ig), o bien el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que

5 codifica para la región Fc variante (es decir, tras la introducción de al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente) a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del anti-

10 cuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la actividad de ADCC del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar

15 un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con actividad de ADCC menor que la del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, disminuida, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La invención caracteriza además un anticuerpo monoclonal, o fragmento funcional del mismo, que comprende una re-

20 gión Fc variante producida mediante el método.

En una realización la descripción proporciona un método para aumentar la afinidad de unión a FcRn de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico (o fragmento funcional del mismo), que comprende modi-

25 ficar por ingeniería genética un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L, 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y,

30 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N, 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P,

376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K o 442K [preferiblemente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L o 438W]. La molécula de ácido nucleico que codifica para la región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente o bien mientras que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de Ig), o bien el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante (es decir, tras la introducción de al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente) a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la afinidad de unión a FcRn del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con afinidad de unión a FcRn mayor que la afinidad de unión a FcRn del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, potenciada, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más).

La invención caracteriza además un anticuerpo monoclonal, o fragmento funcional del mismo, que comprende una región Fc variante producida mediante el método.

En una realización la descripción proporciona un método para aumentar la semi-
 5 vida sérica *in vivo* de un polipéptido, preferiblemente un polipéptido terapéutico, que comprende modificar por ingeniería genética un ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 238L, 244L, 245R, 249P, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 260S, 262L,
 10 270K, 272L, 272R, 279A, 279D, 279G, 279H, 279M, 279N, 279Q, 279R, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283A, 283D, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283N, 283P, 283Q, 283R, 283S, 283T, 283W, 283Y, 285N, 286F, 288N, 288P, 293V, 307A, 307E, 307M, 311A, 311I, 311K, 311L, 311M, 311V, 311W, 312P, 316K, 317P, 318N, 318T, 332F, 332H, 332K, 332L, 332M, 332R, 332S, 332W, 339N,
 15 339T, 339W, 341P, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 343T, 343Y, 375R, 376G, 376I, 376M, 376P, 376T, 376V, 377K, 378D, 378N, 380N, 380S, 380T, 382F, 382H, 382I, 382K, 382L, 382M, 382N, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430T, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W,
 20 434Y, 436I, 436L, 436T, 438K, 438L, 438T, 438W, 440K o 442K, [preferiblemente 245R, 252Y, 256P, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 258D, 262L, 279A, 279D, 279G, 279H, 279N, 279Q, 279S, 279T, 279W, 279Y, 283F, 283H, 283K, 283R, 285N, 286F, 307A, 307E, 307M, 311I, 311K, 311L, 311M, 312P, 318N, 318T, 332S, 339W, 343E, 343H, 343K, 343Q, 343R, 375R, 377K, 378D, 378N, 380S, 380T, 382F, 382K, 382Q, 382R, 382S, 382T, 382V, 382W, 382Y, 423N, 427N, 430A, 430F, 430H, 430I, 430L, 430M, 430N, 430Q, 430R, 430S, 430V, 430Y, 431H, 431K, 434F, 434G, 434H, 434W, 434Y, 436I, 436L, 438K, 438L o 438W]. La molécula de ácido nucleico que codifica para la región Fc variante puede estar operativamente unida a una molécula de ácido nucleico que codifica para
 25 una proteína terapéutica. La molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente mientras que la molécula de ácido nucleico está opera-

tivamente unida a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la región distinta de Fc de la proteína de fusión), o el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante tras la introducción de la al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente a un ácido nucleico que codifica para una pareja de fusión distinta de Fc. El método puede comprender además la expresión y purificación del polipéptido que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del polipéptido que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la semivida sérica *in vivo* del polipéptido que comprende la región Fc variante y del polipéptido que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un polipéptido que comprende una región Fc variante en el que el polipéptido tiene semivida sérica *in vivo* potenciada en comparación con la del polipéptido que comprende la región Fc original (es decir, potenciada, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La invención caracteriza además un polipéptido (es decir, un polipéptido de fusión) que comprende una región Fc variante producida mediante el método.

20

En una realización la descripción proporciona un método para disminuir la afinidad de unión a FcRn de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico (o fragmento funcional del mismo), que comprende modificar por ingeniería genética un ácido nucleico que codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos:

235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, S267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R,

30

341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F o 440M [preferiblemente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248Q, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P o 432S]. La molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente mientras que el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica para una secuencia de anticuerpo adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de Ig), o el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante tras la introducción de la al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la afinidad de unión a FcRn del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con afinidad de unión a FcRn menor que la del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, disminuida, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La descripción caracteriza además un anticuerpo

monoclonal (que comprende una región Fc variante) producido mediante el método.

En otra realización la descripción proporciona un método para disminuir la semivida sérica *in vivo* de un polipéptido, preferiblemente un polipéptido terapéutico, que comprende modificar por ingeniería genética un ácido nucleico que codifica para una región Fc variante que comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235Q, 236Y, 237K, 237R, 238E, 238G, 238H, 238W, 247A, 247D, 247E, 247F, 247G, 247H, 247I, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249Y, 251F, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254L, 254M, 254N, 254P, 254Q, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256I, 256K, 256M, 256R, 256W, 256Y, 264S, 265S, 265Y, 267G, 267I, 268D, 268K, 270A, 270M, 279I, 279K, 279L, 280T, 292E, 292F, 292G, 292I, 292L, 311D, 311E, 311F, 311G, 311N, 311R, 311Y, 315F, 315K, 315P, 316F, 317T, 326W, 327T, 339E, 339G, 339L, 339R, 341D, 341E, 341F, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343M, 343V, 343W, 373A, 373D, 373G, 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373S, 373T, 373V, 373W, 376H, 376L, 376W, 376Y, 424M, 424V, 426D, 429A, 429F, 429M, 430D, 430W, 431P, 432R, 432S, 434I, 439Q, 440A, 440D, 440E, 440F o 440M [preferiblemente 237R, 247D, 247E, 247F, 247H, 247L, 247M, 247N, 247Q, 247W, 247Y, 248A, 248F, 248P, 248Q, 249L, 249M, 249Y, 251H, 251I, 251W, 254D, 254E, 254F, 254G, 254H, 254I, 254K, 254M, 254N, 254P, 254R, 254T, 254V, 254W, 254Y, 255K, 255N, 256F, 256H, 256K, 256M, 256R, 256W, 265Y, 280T, 292G, 292I, 311D, 311E, 311G, 311N, 315F, 315P, 316T, 317T, 327T, 341D, 341E, 341F, 341L, 341Y, 343W, 373A, 373G, 373M, 373Q, 376W, 376Y, 424M, 424V, 430D, 430W, 431P o 432S]. El ácido nucleico que codifica para la región variante Fc puede estar operativamente unido a un ácido nucleico que codifica para una proteína terapéutica. La molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente mientras que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido adicional, (por

- ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la región distinta de Fc de la proteína de fusión), o el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante tras la introducción de la al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente a ácido nucleico que codifica para una pareja de fusión distinta de Fc. El método puede comprender además la expresión y purificación del polipéptido que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del polipéptido que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la semivida sérica *in vivo* del polipéptido que comprende la región Fc variante y del polipéptido que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un polipéptido que comprende una región Fc variante en el que el polipéptido tiene una semivida sérica *in vivo* disminuida en comparación con la del polipéptido que comprende la región Fc original (es decir, disminuida, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La invención caracteriza además un polipéptido (es decir, un polipéptido de fusión) que comprende una región Fc variante producido mediante el método.
- 20 En otra realización la descripción proporciona un método para aumentar la actividad de CDC de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico, que comprende construir la región Fc del anticuerpo para que comprenda al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 236Y, 244L, 247A, 247D, 247E, 247G, 247N, 247Q, 247R, 247S, 247W, 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249P, 249Y, 250K, 250R, 251F, 251H, 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G, 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 256Y, 260S, 268D, 279Q, 279S, 279W, 279Y, 280K, 280T, 283F, 283G, 283H, 283I, 283K, 283L, 283M, 283N, 283P, 283R, 283S, 283W, 292L, 307A, 307M, 311F, 311I, 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 312P, 314F, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315F, 315K, 315L, 315P, 315R, 316K, 317P, 317T, 318N, 318T, 332A, 332D, 332E, 332F, 332G, 332H, 332L, 332M, 332N, 332Q, 332S, 332T, 332V, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339G, 339H, 339I, 339K, 339N, 339Q, 339R, 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M, 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S,

341T, 341V, 341W, 341Y, 343A, 343D, 343E, 343G, 343H, 343K, 343L, 343M,
 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373F, 373H, 373I,
 373K, 373L, 373M, 373N, 373Q, 373R, 373T, 373V, 373W, 375R, 376A, 376F,
 376G, 376H, 376L, 376N, 376P, 376Q, 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N,
 5 379Q, 379S, 379T, 380A, 380N, 380S, 380T, 382I, 382L, 382Q, 382V, 386K,
 426D, 426L, 429A, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K,
 430L, 430M, 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P,
 432R, 432S, 434W, 434Y, 438L, 438W, 440Q o 440Y [preferiblemente 236Y,
 248F, 248P, 248Q, 248W, 249E, 249L, 249M, 249N, 249Y, 250K, 250R, 251H,
 10 251I, 251W, 254A, 254F, 254K, 254L, 254M, 254R, 254Y, 255K, 256A, 256G,
 256I, 256L, 256M, 256P, 256Q, 256W, 260S, 280K, 283W, 307M, 311F, 311I,
 311K, 311L, 311M, 311T, 311V, 311W, 311Y, 314I, 314V, 314W, 314Y, 315P,
 317P, 332D, 332L, 332M, 332S, 332W, 332Y, 339D, 339F, 339I, 339K, 339N,
 339S, 339T, 339W, 339Y, 341D, 341E, 341F, 341H, 341I, 341K, 341L, 341M,
 15 341N, 341P, 341Q, 341R, 341S, 341T, 341V, 341W, 341Y, 343D, 343E, 343G,
 343H, 343K, 343N, 343Q, 343R, 343S, 343T, 343W, 343Y, 373D, 373E, 373H,
 373I, 373K, 373L, 373Q, 373R, 373T, 373W, 376A, 376G, 376N, 376P, 376Q,
 376R, 376S, 376T, 376V, 377P, 379N, 379Q, 379T, 382I, 382L, 386K, 426D,
 426L, 429F, 429M, 430A, 430D, 430F, 430G, 430H, 430I, 430K, 430L, 430M,
 20 430N, 430P, 430R, 430S, 430T, 430V, 430W, 430Y, 431H, 431P, 432R, 434Y,
 438L o 440Y]. La molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc va-
 riante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una mo-
 lécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc original o una región Fc
 nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada
 25 anteriormente mientras que la molécula de ácido nucleico está operativamente
 unida a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional, (por ejemplo,
 la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de
 Ig), o el método puede comprender además posteriormente unir operativamente el
 ácido nucleico que codifica para la región Fc variante tras la introducción de la al
 30 menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente a un ácido nu-
 cleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender
 además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la
 región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purifica-
 ción del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método

puede comprender además medir la actividad de CDC del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además

5 seleccionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con actividad de CDC mayor que la del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, potenciada, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La descripción caracteriza además un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante producido

10 mediante el método.

En otra realización la descripción proporciona un método para disminuir la respuesta de CDC de un anticuerpo monoclonal, preferiblemente un anticuerpo monoclonal terapéutico, que comprende construir la región Fc del anticuerpo para

15 que comprenda al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W, 238Y, 245R, 247H, 247I, 247L, 247T, 247Y, 250M, 252Y, 254D, 254E, 254I, 254P, 254Q, 254T, 254V, 255N, 257A, 257I, 257M, 257N, 257S, 257V, 262L, 264S, 265H, 265Y, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N,

20 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 272L, 272N, 292A, 293S, 301W, 307E, 311E, 311S, 316F, 318P, 327T, 328V, 329Y, 330K, 330R, 332K, 339E, 339M, 343I, 373S, 378D, 380D, 382D, 382F, 382N, 382P, 382R, 382S, 382W, 382Y, 385E, 385P, 423N, 424H, 424M o 427N [preferiblemente 235G, 235S, 236R, 237E, 237K, 237N, 237R, 238A, 238E, 238G, 238H, 238I, 238L, 238V, 238W,

25 238Y, 245R, 247I, 247L, 247T, 250M, 257A, 257I, 257M, 262L, 264S, 267G, 267H, 267I, 267K, 268K, 269N, 269Q, 270G, 270M, 270N, 271T, 272H, 301W, 311S, 327T, 329Y, 330K, 330R, 378D, 385E, 423N o 424H]. La molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante puede modificarse por ingeniería genética (por ejemplo, a partir de una molécula de ácido nucleico que codifica

30 para una región Fc original o una región Fc nativa) para que comprenda al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente mientras que la molécula de ácido nucleico está operativamente unida a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional, (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica para el resto de la cadena pesada de Ig), o el método puede comprender

además posteriormente unir operativamente el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante tras la introducción de la al menos una sustitución de aminoácido enumerada anteriormente a un ácido nucleico que codifica para un anticuerpo adicional. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante. El método puede comprender además la expresión y purificación del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original. El método puede comprender además medir la actividad de CDC del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante y del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original mediante cualquier método disponible en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El método puede comprender además seleccionar un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante con actividad de CDC menor que la del anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original (es decir, disminuida, preferiblemente en al menos el 5%, el 10%, el 12%, el 14%, el 16%, el 18%, el 20% o más). La descripción caracteriza además un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante producida mediante el método.

En otra realización, la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante de la invención o un fragmento funcional de la misma. Más preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada comprende un ácido nucleico que codifica para un polipéptido que comprende una región Fc variante de la invención. Preferiblemente, el polipéptido de región Fc variante codificado por dicho ácido nucleico tiene una sustitución de aminoácido mostrada en la tabla 1 en comparación con la región Fc original de la variante. Preferiblemente, el polipéptido es un anticuerpo monoclonal, e incluso más preferiblemente, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo de longitud completa o un anticuerpo de cadena sencilla. El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano.

30

En otra realización, la descripción proporciona un vector, preferiblemente (pero sin limitarse a) un plásmido, un vector de expresión recombinante, un vector de expresión de levaduras o un vector de expresión retroviral que comprende un poli-

nucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un polipéptido de región Fc variante de la invención.

En otra realización, la descripción proporciona una célula huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, una célula huésped comprende uno o más vectores o constructos que comprenden una molécula de ácido nucleico de la presente invención. La célula huésped es una célula en la que se ha introducido un vector de la invención (por ejemplo, mediante transformación, transducción, infección, transfección, electroporación y similares), comprendiendo dicho vector un polinucleótido que codifica para un polipéptido que comprende un polipéptido de región Fc variante. Opcionalmente, el vector puede incorporarse de manera estable en el cromosoma de la célula huésped. Los tipos de célula huésped incluyen células de mamíferos, bacterianas, vegetales y de levaduras. Preferiblemente, la célula huésped es una célula CHO, una célula COS, una célula SP2/0, una célula NSO, una célula de levaduras o un derivado o progenie de cualquier tipo de célula preferido.

En otra realización, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que comprende una región Fc variante, o fragmento funcional de la misma. Preferiblemente, el polipéptido es un anticuerpo monoclonal, incluso más preferiblemente, un anticuerpo monoclonal terapéutico. El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal quimérico, humanizado o humano. Alternativamente, el polipéptido puede ser un polipéptido distinto de un anticuerpo que se beneficia de una semivida sérica alterada conferida al polipéptido al unirse operativamente a, y expresarse conjuntamente con, una región Fc variante de la invención. La composición farmacéutica puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En dicha composición farmacéutica, el polipéptido que comprende la región Fc variante es el principio activo. Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende una población homogénea o sustancialmente homogénea de anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante de la invención. La composición farmacéutica para uso terapéutico es preferiblemente estéril y puede estar liofilizada.

- La descripción proporciona un método de inhibición de la actividad de una proteína en un mamífero, preferiblemente un ser humano, que lo necesita que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz, o cantidad profilácticamente eficaz, de un polipéptido (preferiblemente un anticuerpo monoclonal) que
- 5 comprende una región Fc variante de la invención a dicho mamífero. Preferiblemente, el polipéptido que comprende la región Fc variante es una pareja de unión de la proteína que va a inhibirse. Se proporciona además un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno mejorado por la inhibición de la transducción de señales que resulta de la unión de un anticuerpo monoclonal que
- 10 comprende una región Fc variante de la invención a su epítipo antigénico que comprende administrar a un paciente (por ejemplo, un ser humano) que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal.
- 15 La descripción caracteriza un artículo de fabricación que comprende un material de envasado y un polipéptido que comprende un polipéptido de región Fc variante de la invención contenido dentro de dicho material de envasado. La descripción caracteriza además composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales y polipéptidos heterólogos que comprenden una región Fc variante descrita en el
- 20 presente documento, y un vehículo o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende: i) una región de entramado humana no modificada ("FR") (por ejemplo, no se ha hecho ninguna alteración en un entramado humano que se produce

25 de manera natural), y ii) una región Fc variante. En determinadas realizaciones, el entramado humano no modificado es un entramado de línea germinal humana. En otras realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden un polipéptido, comprendiendo el polipéptido: i) al menos una secuencia

30 de CDR aleatorizada y ii) una región Fc variante de la invención. En realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden un polipéptido, comprendiendo el polipéptido: i) un entramado humano no modificado (por ejemplo, entramado de línea germinal humana), ii) al menos una secuencia de CDR aleatorizada y iii) una región Fc variante.

La presente descripción contempla usos terapéuticos y de diagnóstico para polipéptidos heterólogos de anticuerpos monoclonales que comprenden una región Fc variante dada a conocer en el presente documento.

5

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra una representación esquemática de una molécula de IgG con las diversas regiones y secciones marcadas.

- 10 La figura 2 muestra una alineación de diversas secuencias de aminoácidos de Fc originales, incluyendo IgG1 humana ((SEQ ID NO: 1) con alotipos a y distinto de a mostrados), IgG2 humana (SEQ ID NO: 2), IgG3 humana (SEQ ID NO: 3), IgG4 humana (SEQ ID NO: 4), IgG1 murina (SEQ ID NO: 5), IgG2A murina (SEQ ID NO: 6), IgG2B murina (SEQ ID NO: 7) e IgG3 murina (SEQ ID NO: 8).

15

La figura 3 muestra diversas secuencias de aminoácidos, incluyendo la región CH2 (SEQ ID NO: 9) y la región CH3 (SEQ ID NO: 10) de IgG1 humana, así como secuencias de un alotipo f (SEQ ID NO: 11) y alotipo a, z (SEQ ID NO: 12) de IgG1 humana que incluyen las regiones CH1, bisagra, CH2 y CH3.

20

- La figura 4 muestra diversas secuencias de aminoácidos comprendidas dentro de: (a) la región variable de cadena ligera (LCVR) de anticuerpo anti-CD20 (I) (SEQ ID NO: 13); (b) la región variable de cadena pesada (HCVR) de anticuerpo anti-CD20 (I) (SEQ ID NO: 14); (c) LCVR de anticuerpo anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 15); y HCVR de anticuerpo anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 16). La figura 4e muestra secuencias de aminoácidos comprendidas dentro de la región variable de un anticuerpo anti-CD20. (Véanse la solicitud provisional estadounidense 60/471.958, presentada el 20 de mayo de 2003 y la patente estadounidense 5.843.439).

- 30 La figura 5a muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa para el anticuerpo anti-CD20 AME 133. La figura 5b muestra la secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera completa para AME 133.

La figura 6 muestra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos para la cadena pesada completa de tres variantes preferidas del anticuerpo anti-CD20 AME 133. Específicamente, la figura 6a muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de la variante 247I/339Q. La figura 6b muestra la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de la variante 247I/339Q. La figura 6c muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de la variante 247I/339D. La figura 6d muestra la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de la variante 247I/339D. La figura 6e muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de la variante 378D. La figura 6f muestra la secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de la variante 378D.

Descripción detallada

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la numeración de los residuos de aminoácido en una cadena pesada de inmunoglobulina (región Fc) es la del índice de EU como en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice de EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo de IgG humana y se refleja en el presente documento en la figura 2. Por ejemplo, en la posición 438, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 humanas e IgG3 murina tienen todos un aminoácido Q, mientras que IgG1 murina tiene un aminoácido I, IgG2a murina tiene un aminoácido T e IgG2B murina tiene un aminoácido K. Además, se nombran sustituciones en el presente documento mediante el número de posición de aminoácido en el que se produce la sustitución seguido por el aminoácido que sustituye al presente en la región Fc original en la misma posición (por ejemplo, 249G indica un residuo de glicina que sustituye al presente en la posición 249 de la región Fc original). El número se refiere a la posición en IgG1 humana independientemente de si la región Fc original es o no IgG1 humana; si la región Fc original no es IgG1 humana, el número se refiere a la posición homóloga en la región Fc original si estuviese alineada con IgG1 humana en esa posición.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal en el que puede usarse terapéuticamente un polipéptido

do que comprende una región Fc variante de la invención incluyendo un ser humano así como otros mamíferos (tales como por ejemplo animales domésticos (por ejemplo, caninos, felinos), animales para deportes (por ejemplo, equinos) y animales como fuente de alimentos (por ejemplo, bovinos, porcinos y ovinos)) que
5 pueden beneficiarse de tal terapia.

Tal como se usa en el presente documento, "tratamiento o prevención" se refiere a una enfermedad o trastorno asociado con niveles anómalos de una proteína o que se ve beneficiado por la alteración de una actividad o un nivel de una proteí-
10 na.

El término "aislado" cuando se usa en relación con un ácido nucleico es un ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos un ácido nucleico contaminante con el que está habitualmente asociado en su fuente natural. Un ácido nucleico
15 aislado está en una forma o entorno diferente del que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, se distinguen moléculas de ácido nucleico aislado de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. Una molécula de ácido nucleico aislado incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que expresan habitualmente el polipéptido codificado en las mismas en las que, por
20 ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en un plásmido o una ubicación cromosómica diferente de la de células naturales. El ácido nucleico aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando va a utilizarse una molécula de ácido nucleico aislado para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la hebra sentido o codificante, pero pue-
25 de contener las hebras tanto sentido como antisentido (es decir, puede ser bicatenaria).

Una molécula de ácido nucleico está "operativamente unida" u "operativamente acoplada" cuando está colocada en una relación funcional con otra molécula de
30 ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante de ácido nucleico si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia codificante de ácido nucleico si está situado de modo que facilita la traducción. Una molécula de ácido nucleico que codifica para una región Fc variante

está operativamente unida a una molécula de ácido nucleico que codifica para una proteína heteróloga (es decir, una proteína o fragmento funcional de la misma que, tal como existe en la naturaleza, no comprende una región Fc) si está situada de manera que la proteína de fusión expresada comprende la proteína heteró-
 5 loga o fragmento funcional de la misma unida o bien en sentido de 5' o bien en el sentido de 3' con respecto al polipéptido de región Fc variante; la proteína heteróloga puede estar inmediatamente adyacente al polipéptido de región Fc variante o puede estar separado de la misma por una secuencia de ligador de cualquier longitud y composición. Asimismo, una molécula de polipéptido (usado de manera
 10 sinónima en el presente documento con "proteína) está "operativamente" u "operativamente acoplada" cuando está colocada en una relación funcional con otro polipéptido.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento funcional" en
 15 referencia a un polipéptido o una proteína (por ejemplo, una región Fc variante, o un anticuerpo monoclonal) se refiere a fragmentos de esa proteína que conservan al menos una función del polipéptido de longitud completa. Los fragmentos pueden oscilar en tamaño entre seis aminoácidos y la secuencia de aminoácidos entera del polipéptido de longitud completa menos un aminoácido. Un fragmento
 20 funcional de un polipéptido de región Fc variante de la presente invención conserva al menos una "sustitución de aminoácido" tal como se define en el presente documento. Un fragmento funcional de un polipéptido de región Fc variante conserva al menos una función que se sabe en la técnica que está asociada con la región Fc (por ejemplo, ADCC, CDC, unión a receptor de Fc, unión a C1q, regula-
 25 ción por disminución de receptores de la superficie celular o puede, por ejemplo, aumentar la semivida *in vivo* o *in vitro* de un polipéptido al que está operativamente unido).

El término "purificado" o "purificar" se refiere a la eliminación sustancial de al me-
 30 nos un contaminante de una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo específico de antígeno puede purificarse mediante la eliminación completa o sustancial (al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95% o más, preferiblemente al menos el 96%, el 97%, el 98% o el 99%) de al menos una proteína distinta de inmunoglobulina contaminante; también puede purificarse mediante la eliminación

de proteína de inmunoglobulina que no se une al mismo antígeno. La eliminación de proteínas distintas de inmunoglobulina y/o la eliminación de inmunoglobulinas que no se unen a un antígeno particular da como resultado un aumento en el porcentaje de inmunoglobulinas específicas de antígeno en la muestra. En otro ejemplo, un polipéptido (por ejemplo, una inmunoglobulina) expresado en células huésped bacterianas se purifica mediante la eliminación completa o sustancial de proteínas de células huésped; el porcentaje del polipéptido aumenta de ese modo en la muestra.

El término “nativo” cuando se refiere a un polipéptido (por ejemplo, región Fc) se usa en el presente documento para indicar que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos del polipéptido tal como se produce comúnmente en la naturaleza o un polimorfismo del mismo que se produce de manera natural. Puede producirse un polipéptido nativo (por ejemplo, región Fc nativa) por medios recombinantes o puede aislarse de una fuente que se produce de manera natural.

El término “vector de expresión” tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula de ADN recombinante que contiene una secuencia codificante deseada y secuencias de ácido nucleico apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia codificante operativamente unida en un organismo huésped particular.

Tal como se usa en el presente documento, el término “célula huésped” se refiere a cualquier célula eucariota o procariota (por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli*, células CHO, células de levaduras, células de mamífero, células de aves, células de anfibios, células vegetales, células de peces y células de insectos), ya estén ubicadas *in vitro* o *in situ*, o *in vivo*. Por ejemplo, las células huésped pueden estar ubicadas en un animal transgénico.

30

Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido original” es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que puede cambiarse o alterarse (por ejemplo, una sustitución de aminoácido) para producir una variante (es decir, polipéptido variante). En realizaciones preferidas, el polipéptido original

comprende al menos una parte de una región Fc nativa o no nativa, es decir, una región Fc que se produce de manera natural o una región Fc con al menos una modificación en la secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, se contemplan específicamente variantes que son más cortas o más largas que el polipéptido original. En realizaciones particularmente preferidas, el polipéptido original difiere en función (por ejemplo, función efectora potenciada o disminuida, unión a receptor, semivida *in vivo* o *in vitro*, etc.) en comparación con la variante.

Tal como se usa en el presente documento, el término “variante de un polipéptido original” se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la del polipéptido original en al menos una sustitución de aminoácido. En determinadas realizaciones, la variante comprende al menos el 40%, el 45%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85% o el 90% o lo más preferiblemente al menos el 95%, el 97% o el 99% de una región Fc (es decir, una “parte” de la región Fc). En realizaciones preferidas, una región Fc variante de un polipéptido original comprende al menos una sustitución de aminoácido con respecto al polipéptido original, siendo la sustitución en la región Fc. El polipéptido original puede ser o no un polipéptido nativo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “región Fc” se refiere a una región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, tal como se muestra en la figura 1). La “región Fc” puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites generalmente aceptados de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente en un tramo de desde un residuo de aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo terminal de la misma. En algunas realizaciones, las variantes comprenden sólo porciones de la región Fc y pueden incluir o no el extremo carboxilo terminal. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, CH2 y CH3, tal como se muestra, por ejemplo, en la figura 1. En algunas realizaciones, se contemplan variantes que tienen uno o más de los dominios constantes. En otras realizaciones, se contemplan variantes sin tales dominios constantes (o sólo con partes de tales dominios constantes).

El “dominio CH2” de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio “C γ 2”) se extiende habitualmente desde aproximadamente el aminoácido 231 hasta aproximadamente el aminoácido 340 (véase la figura 2). El dominio CH2 es único porque no está estrechamente apareado con otro dominio. Se interponen
 5 dos cadenas de hidrato de carbono ramificadas unidas a N entre los dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta.

El “dominio CH3” de una región Fc de IgG humana (también denominado dominio “C γ 3”) es generalmente el tramo de residuos C-terminales con respecto a un do-
 10 minio CH2 en una región Fc que se extiende desde aproximadamente el residuo de aminoácido 341 hasta aproximadamente el residuo de aminoácido 447 (véase la figura 2).

Una “región Fc funcional” presenta una “función efectora” de una región Fc de se-
 15 cuencia nativa. Al menos una función efectora de un polipéptido que comprende una región Fc variante de la presente invención puede potenciarse o disminuirse con respecto a un polipéptido que comprende una región Fc nativa o la región Fc original de la variante. Los ejemplos de funciones efectoras incluyen, pero no se limitan a: unión a C1q; citotoxicidad dependiente del complemento (CDC); unión a
 20 receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras pueden requerir que la región Fc esté operativamente unida a un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueden evaluarse usan-
 25 do diversos ensayos (por ejemplo, ensayo de unión a Fc, ensayos de ADCC, ensayos de CDC, agotamiento de células diana a partir de muestras de sangre completa o fraccionada, etc.).

Una “región Fc de secuencia nativa” o “región Fc de tipo natural” se refiere a una
 30 secuencia de aminoácidos que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc comúnmente encontrada en la naturaleza. Se muestran regiones Fc humanas de secuencia nativa a modo de ejemplo en la figura 2 e incluyen una región Fc de IgG 1 humana de secuencia nativa (alotipos f y a,z, es decir, alotipos A y distintos de A); una región Fc de IgG2 humana de secuencia nativa; una región

Fc de IgG3 humana de secuencia nativa; y una región Fc de IgG4 humana de secuencia nativa así como variantes de las mismas que se producen de manera natural. También se muestran en la figura 2 regiones Fc murinas de secuencia nativa.

5

Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que difiere de la de una región Fc de secuencia nativa (o fragmento de la misma) en virtud de al menos una "sustitución de aminoácido" tal como se define en el presente documento. En realizaciones preferidas, la región Fc variante tiene al menos una susti-
 10 tución de aminoácido en comparación con una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc de un polipéptido original, preferiblemente 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido original. En una realización alternativa, puede generarse una región Fc variante según los métodos en el presente documento dados a conocer y esta re-
 15 gión Fc variante puede fusionarse con un polipéptido heterólogo de elección, tal como un dominio variable de anticuerpo o un polipéptido distinto de anticuerpo, por ejemplo, un dominio de unión de un receptor o ligando.

Tal como se usa en el presente documento, el término "derivado" en el contexto
 20 de polipéptidos se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que se ha alterado mediante la introducción de una sustitución de residuo de aminoácido. El término "derivado" tal como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido que se ha modificado mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a
 25 modo de limitación, un anticuerpo puede modificarse, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos bloqueantes/protectores conocidos, escisión proteolítica, unión a ligando celular u otra proteína, etc. Puede producirse un polipéptido derivado mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica,
 30 incluyendo, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un polipéptido derivado presenta una función similar o idéntica al polipéptido del que se derivó. Se entiende que un polipéptido que comprende una región Fc variante de la presente in-

vención puede ser un derivado tal como se define en el presente documento, preferiblemente la derivatización se produce dentro de la región Fc.

“Sustancialmente de origen humano” tal como se usa en el presente documento en referencia a un polipéptido (por ejemplo, una región Fc o un anticuerpo monoclonal), indica que el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 80%, al menos el 85%, más preferiblemente al menos el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94% o incluso más preferiblemente al menos el 95%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% homóloga a la de un polipéptido de amino humano nativo.

10

Los términos “receptor de Fc” o “FcR” se usan para describir un receptor que se une a una región Fc (por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo). El FcR preferido es un FcR de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo de IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas cortadas y empalmadas de manera alternativa de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activante”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. Se revisan FcR en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel, *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otro FcR preferido incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)). Otros FcR, incluyendo los que van a identificarse en el futuro, se abarcan por el término “FcR” en el presente documento.

La frase “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas (por ejemplo, no específicas) que expresan FcR (por ejemplo, células citolíticas naturales (“*Natural Killer*”, “NK”), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente provocan la lisis de las células diana. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII sólo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII.

Tal como se usa en el presente documento, la frase “células efectoras” se refiere a leucocitos (preferiblemente humanos) que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y rea-
 5 lizan una función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos que median en la ADCC incluyen PBMC, células NK, monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa (por ejemplo, de san-
 gre o PBMC).

10 Un polipéptido variante con afinidad de unión a FcRn “alterada” es uno que tiene afinidad de unión a FcRn o bien potenciada (es decir, aumentada, mayor o supe-
 rior) o bien disminuida (es decir, reducida, disminuida o menor) en comparación con el polipéptido original variante o con un polipéptido que comprende una región Fc nativa cuando se mide a pH 6,0. Un polipéptido variante que presenta unión
 15 aumentada o afinidad de unión aumentada a un FcRn se une a FcRn con mayor afinidad que el polipéptido original. Un polipéptido variante que presenta unión disminuida o afinidad de unión disminuida a un FcRn se une a FcRn con afinidad inferior que su polipéptido original. Tales variantes que presentan unión disminu-
 da a un FcRn pueden presentar poca o ninguna unión apreciable a un FcRn, por
 20 ejemplo, el 0-20% de unión al FcRn en comparación con un polipéptido original. Un polipéptido variante que se une a un FcRn con “afinidad potenciada” en com-
 paración con su polipéptido original es uno que se une a FcRn con afinidad de unión superior que el polipéptido original, cuando las cantidades de polipéptido
 variante y polipéptido original en un ensayo de unión son esencialmente la mis-
 25 mas, y todas las otras condiciones son idénticas. Por ejemplo, un polipéptido va-
 riente con afinidad de unión a FcRn potenciada puede presentar un aumento de
 desde aproximadamente 1,10 veces hasta aproximadamente 100 veces (más
 normalmente desde aproximadamente 1,2 veces hasta aproximadamente 50 ve-
 ces) en la afinidad de unión a FcRn en comparación con el polipéptido original, en
 30 el que la afinidad de unión a FcRn se determina, por ejemplo, en un ensayo ELI-
 SA u otro método disponible para un experto habitual en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, una “sustitución aminoácido” se refie-
 re al reemplazo de al menos un residuo de aminoácido existente en una secuen-

cia de aminoácidos dada por otro residuo de aminoácido de “reemplazo” diferente. El residuo o residuos de reemplazo pueden ser “residuos de aminoácido que se producen de manera natural” (es decir, codificados por el código genético) y seleccionados de: alanina (Ala); arginina (Arg); asparagina (Asn); ácido aspártico (Asp); cisteína (Cys); glutamina (Gln); ácido glutámico (Glu); glicina (Gly); histidina (His); isoleucina (Ile); leucina (Leu); lisina (Lys); metionina (Met); fenilalanina (Phe); prolina (Pro); serina (Ser); treonina (Thr); triptófano (Trp); tirosina (Tyr); y valina (Val). La sustitución por uno o más residuos de aminoácido que no se producen de manera natural también se abarca por la definición de una sustitución de aminoácido en el presente documento. Un “residuo de aminoácido que no se produce de manera natural” se refiere a un residuo, distinto de los residuos de aminoácido que se producen de manera natural enumerados anteriormente, que puede unirse covalentemente a residuo(s) de aminoácido adyacente(s) en una cadena de polipéptido. Los ejemplos de residuos de aminoácido que no se producen de manera natural incluyen norleucina, ornitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácido tales como los descritos en Ellman *et al.* Met. Enzym. 202: 301-336 (1991).

El término “señal de ensayo” se refiere a la salida de cualquier método de detección de interacciones proteína-proteína, incluyendo pero sin limitarse a, mediciones de absorbancia a partir de ensayos colorimétricos, intensidad fluorescente o desintegraciones por minuto. Los formatos de ensayo podrían incluir ELISA, FACS u otros métodos. Un cambio en la “señal de ensayo” puede reflejar un cambio en la viabilidad celular y/o un cambio en la velocidad de disociación cinética, la velocidad de asociación cinética o ambas. Una “señal de ensayo superior” se refiere a que el número de salida medido es más grande que otro número (por ejemplo, una variante puede tener un número medido superior (más grande) en un ensayo ELISA en comparación con el polipéptido original). Una señal de ensayo “inferior” se refiere a que el número de salida medido es más pequeño que otro número (por ejemplo, una variante puede tener un número medido inferior (más pequeño) en un ensayo ELISA en comparación con el polipéptido original).

El término “afinidad de unión” se refiere a la constante de disociación en equilibrio (expresada en unidades de concentración) asociada con cada interacción de

unión Fc-receptor de Fc. La afinidad de unión está directamente relacionada con la razón de la velocidad de disociación cinética (notificada generalmente en unidades de inversa del tiempo, por ejemplo, segundos⁻¹) dividida entre la velocidad de asociación cinética (notificada generalmente en unidades de concentración por unidad de tiempo, por ejemplo, molar/segundo). En general, no es posible establecer de manera inequívoca si los cambios en las constantes de disociación en equilibrio se deben a diferencias en las velocidades de asociación, las velocidades de disociación o ambas a menos que cada uno de estos parámetros se determine experimentalmente (por ejemplo, mediante mediciones de BIACORE o
 5
 10 SAPHIDYNE).

Tal como se usa en el presente documento, el término “región bisagra” se refiere al tramo de aminoácidos en IgG1 humana que se extiende desde Glu216 hasta Pro230 de IgG1 humana. Pueden alinearse regiones bisagra de otros isotipos de
 15 IgG con la secuencia de IgG1 colocando los residuos de cisteína primero y último que forman los enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones.

“C1q” es un polipéptido que incluye un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo
 20 C1, el primer componente de la ruta de CDC.

Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se usa de manera intercambiable con “inmunoglobulina” o “Ig”, se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos mo-
 25 noclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad funcional o actividad biológica deseada. Anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos quiméricos, humanos, humanizados o primatizados (injertados con CDR), así como anticuerpos de cadena sencilla qui-
 30 méricos o injertados con CDR, y similares, que comprenden partes derivadas de diferentes especies, también se abarcan por la presente invención y el término “anticuerpo”. Las diversas partes de estos anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente mediante técnicas convencionales, de manera sintética o pueden prepararse como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

Por ejemplo, pueden expresarse ácidos nucleicos que codifican para una cadena quimérica o humanizada para producir una proteína contigua. Véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567; la patente europea n.º 0.125.023 B1; la patente estadounidense n.º 4.816.397; la patente europea n.º 0.120.694 B1; 5 el documento WO 86/01533; la patente europea n.º 0.194.276 B1; la patente estadounidense n.º 5.225.539; la patente europea n.º 0.239.400 B1 y las patentes estadounidenses n.ºs 5.585.089 y 5.698.762. Véanse también Newman, R. *et al.* BioTechnology, 10:1455-1460, 1993, con respecto a anticuerpo primatizado, y Ladner *et al.*, patente estadounidense n.º 4.946.778 y Bird, R.E. *et al.*, Science, 10 242:423-426, 1988, con respecto a anticuerpos de cadena sencilla. Se entiende que todas las formas de los anticuerpos que comprenden una región Fc (o parte de la misma) se abarcan en el presente documento dentro del término "anticuerpo". Además, el anticuerpo puede marcarse con un marcador detectable, inmovilizarse sobre una fase sólida y/o conjugarse con un compuesto heterólogo (por ejemplo, una enzima o toxina) según métodos conocidos en la técnica. 15

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a una parte de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; péptidos de Fc o Fc', Fab y fragmentos de Fab, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo conservan preferiblemente al menos parte de la bisagra y opcionalmente la región CH1 de una cadena pesada de IgG. En otras realizaciones preferidas, los fragmentos de anticuerpo comprenden al menos una parte 20 de la región CH2 o toda la región CH2. 25

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento funcional", cuando se usa en referencia a un anticuerpo monoclonal, pretende referirse a una parte del anticuerpo monoclonal que todavía conserva una actividad funcional. 30 Una actividad funcional puede ser, por ejemplo, especificidad o actividad de unión a antígeno, especificidad o actividad de unión a receptor, actividad de función efectora y similares. Los fragmentos funcionales de anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, cadenas pesadas o ligeras individuales y fragmentos de las mismas, tales como VL, VH y Fd; fragmentos monovalentes, tales como Fv, Fab,

y Fab'; fragmentos bivalentes tales como F(ab')₂; Fv de cadena sencilla (scFv); y fragmentos de Fc. Tales términos se describen en, por ejemplo, Harlowe y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers, R.A. (ed.), Nueva York: VCH Publisher, Inc.); Huston *et al.*, *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Pluckthun y Skerra, *Met. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) y en Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, segunda ed., Wiley-Liss, Inc., Nueva York, NY (1990). El término fragmento funcional pretende incluir, por ejemplo, fragmentos producidos mediante digestión con proteasas o reducción de un anticuerpo monoclonal y mediante métodos de ADN recombinante conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 100 o más residuos de aminoácido contiguos de la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido. En una realización preferida, un fragmento de un polipéptido conserva al menos una función del polipéptido de longitud completa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo quimérico" incluye inmunoglobulinas monovalentes, divalentes o polivalentes. Un anticuerpo quimérico monovalente es un dímero formado por una cadena pesada quimérica asociada a través de puentes disulfuro con una cadena ligera quimérica. Un anticuerpo quimérico divalente es un tetrámero formado por dos dímeros de cadena pesada-cadena ligera asociados a través de al menos un puente disulfuro. Una cadena pesada quimérica de un anticuerpo para su uso en seres humanos comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena pesada de un anticuerpo no humano, que se une a al menos una parte de una región constante de cadena pesada humana, tal como CH1 o CH2. Una cadena ligera quimérica de un anticuerpo para su uso en seres humanos comprende una región de unión a antígeno derivada de la cadena ligera de un anticuerpo no humano, unida a al menos una parte de una región constante de cadena ligera humana (CL). También pueden prepararse anticuerpos, fragmentos o derivados que tienen cadenas ligeras y cadenas pesadas quiméricas de la misma especificidad de unión de región varia-

ble o diferente mediante la asociación apropiada de las cadenas polipeptídicas individuales, según etapas de método conocidas. Con este enfoque, se cultivan por separado huéspedes que expresan cadenas pesadas quiméricas de huéspedes que expresan cadenas ligeras quiméricas, y se recuperan por separado las cadenas de inmunoglobulina y entonces se asocian. Alternativamente, los huéspedes pueden cultivarse conjuntamente y se deja que las cadenas se asocien espontáneamente en el medio de cultivo, seguido por la recuperación del fragmento o inmunoglobulina ensamblada o tanto las cadenas tanto pesadas como ligeras pueden expresarse en la misma célula huésped. Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs: 6.284.471; 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397).

Tal como se usa en el presente documento, formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) (es decir, anticuerpos humanizados) son anticuerpos que contienen una secuencia mínima, o ninguna secuencia, derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se reemplazan residuos de una región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región de entramado (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se hacen generalmente para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables (CDR) corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Se describe un método a modo de ejemplo para generar anticuerpos humanizados en la patente estadounidense 5.225.539.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan el dominio de unión de una proteína “adhesina” heteróloga (por ejemplo, un receptor, un ligando o una enzima) con un dominio constante de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de la secuencia de aminoácidos de la adhesina con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de unión a y reconocimiento de antígeno (sitio de combinación de antígeno) de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”) con una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio de unión a ligando” se refiere a cualquier receptor nativo o cualquier región o derivado de la misma que conserva al menos una capacidad de unión a ligando cualitativa de un receptor nativo correspondiente. En determinadas realizaciones, el receptor es de un polipéptido de la superficie celular que tiene un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la superfamilia génica de inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la superfamilia génica de inmunoglobulinas pero que no obstante se cubren específicamente por esta definición son receptores para citocinas, y en particular receptores con actividad tirosina cinasa (tirosina cinasas receptoras), miembros de las superfamilias de hematopoyetina y receptor de factor de crecimiento nervioso y moléculas de adhesión celular (por ejemplo, E-, L- y P-selectinas).

Tal como se usa en el presente documento, el término “dominio de unión a receptor” se refiere a cualquier ligando nativo para un receptor, incluyendo, por ejemplo, moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de tal ligando nativo que conserva al menos una capacidad de unión a receptor cualitativa de un ligando nativo correspondiente.

Tal como se usa en el presente documento, el término “quimera de anticuerpo-inmunoadhesina” comprende una molécula que combina al menos un dominio de unión de un anticuerpo con al menos una inmunoadhesina. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, las quimeras de CD4-IgG biespecíficas descritas en

Berg *et al.*, PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) y Charnow *et al.*, J. Immunol., 153: 4268 (1994).

5 Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos terapéuticos o de diagnóstico para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En determinadas realizaciones, el polipéptido aislado se purifica (1) hasta más del 95% en
10 peso de polipéptidos tal como se determina mediante el método de Lowry, y preferiblemente, más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-page en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie
15 o tinción de plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes puesto que al menos un componente del entorno natural del polipéptido no estará presente. Sin embargo, habitualmente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los sujetos o pacientes que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que va a prevenirse el trastorno.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término “trastorno” y “enfermedad” se usan de manera intercambiable para referirse a cualquier estado que se beneficiaría del tratamiento con un polipéptido variante (un polipéptido que comprende una región Fc variante de la invención), incluyendo enfermedades o trastornos agudos y crónicos (por ejemplo, estados patológicos que predisponen a un pa-
30 ciente a un trastorno particular). En determinadas realizaciones, el trastorno es cáncer. En determinadas realizaciones, el término “enfermedad autoinmunitaria” se usa de manera intercambiable con el término “trastorno autoinmunitario” para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por lesión celular, tisular y/u orgánica provocada por una reacción inmunológica del sujeto frente a sus propias

células, tejidos y/u órganos. El término “enfermedad inflamatoria” se usa de manera intercambiable con el término “trastorno inflamatorio” para referirse a un estado en un sujeto caracterizado por inflamación. Los trastornos autoinmunitarios pueden estar asociados o no con inflamación. Además, la inflamación puede estar
 5 provocada o no por un trastorno autoinmunitario. Determinados trastornos pueden caracterizarse como trastornos tanto autoinmunitarios como inflamatorios.

Tal como se usan en el presente documento, los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza
 10 normalmente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma del pulmón, carcinoma escamoso del pulmón, cáncer
 15 del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma
 20 hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Tal como se usa en el presente documento, el término “marcador” se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con un polipéptido. El marcador puede ser por sí mismo detectable (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático,
 25 puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “receptor” se refiere a un polipéptido que puede unirse a al menos un ligando. El receptor preferido es un
 30 receptor soluble o de la superficie celular que tiene un dominio de unión a ligando extracelular y, opcionalmente, otros dominios (por ejemplo, dominio transmembrana, dominio intracelular y/o anclaje a membrana). Un receptor que va a evaluarse en un ensayo descrito en el presente documento puede ser un receptor intacto o un fragmento o derivado del mismo (por ejemplo una proteína de fusión

que comprende el dominio de unión del receptor fusionado a uno o más polipéptidos heterólogos). Además, el receptor que va a evaluarse para determinar sus propiedades de unión puede estar presente en una célula o aislado y opcionalmente recubierto sobre una placa de ensayo o alguna otra fase sólida o puede
5 marcarse directamente y usarse como sonda.

Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad sensible a anticuerpos” se refiere a cualquier enfermedad o estado médico que se muestra que puede tratarse, al menos en parte, con terapia con anticuerpos. Los ejemplos de
10 tales enfermedades y estados médicos incluyen, pero no se limitan a, linfoma (que se muestra que puede tratarse con RITUXAN), enfermedad infecciosa (virus sincitial respiratorio que se muestra que puede tratarse con SYNAGIS), trasplante de riñón (ZENAPAX ha mostrado ser útil), enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (que se muestra que pueden tratarse con REMICADE), carcinoma de mama
15 (que se muestra que puede tratarse con HERCEPTIN) y cáncer de colon (que se muestra que puede tratarse con EDRECOLOMAB). Tal como se usa en el presente documento, el término “enfermedad sensible a inmunoadhesinas” se refiere a cualquier enfermedad o estado médico que se muestra que puede tratarse, al menos en parte, con terapia con inmunoadhesinas.

20

Tal como se usa en el presente documento, un polipéptido variante que “media en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras humanas más eficazmente” que un anticuerpo original es uno que *in vitro* o *in vivo* es sustancialmente más eficaz en la mediación de la
25 ADCC, cuando las cantidades de polipéptido variante y anticuerpo original usadas en el ensayo son esencialmente las mismas. Por ejemplo, una variante de este tipo provoca una cantidad superior de lisis de células diana en un ensayo de ADCC dado que el polipéptido original en un ensayo de ADCC idéntico. Tales variantes pueden identificarse, por ejemplo, usando un ensayo de ADCC, pero pueden emplearse también otros ensayos o métodos para determinar la actividad de ADCC
30 (por ejemplo, modelos animales). En realizaciones preferidas, el polipéptido variante es desde aproximadamente 1,2, 1,3 ó 1,4 veces, 1,5 veces, 50 veces, 100 veces, aproximadamente 500 veces o aproximadamente 1000 veces más eficaz en la mediación de la ADCC el polipéptido original.

El término “síntomas de una enfermedad sensible a anticuerpos o inmunoadhesinas” se refiere a los síntomas generalmente asociados con una enfermedad particular. Por ejemplo, los síntomas normalmente asociados con la enfermedad de Crohn incluyen: dolor abdominal, diarrea, hemorragia rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito, deshidratación, anemia, distensión, fibrosis, intestinos inflamados y malnutrición. La frase “en condiciones tales que los síntomas se reducen” se refiere a cualquier grado de reducción cualitativa o cuantitativa en síntomas detectables de cualquier enfermedad sensible a anticuerpos o inmunoadhesinas, incluyendo pero sin limitarse a, un impacto detectable en la tasa de recuperación de la enfermedad (por ejemplo, tasa de ganancia de peso), o la reducción de al menos uno de los síntomas normalmente asociados con la enfermedad particular (por ejemplo, si la enfermedad sensible a anticuerpos o inmunoadhesinas era enfermedad de Crohn, una reducción en al menos uno de los siguientes síntomas: dolor abdominal, diarrea, hemorragia rectal, pérdida de peso, fiebre, pérdida de apetito, deshidratación, anemia, distensión, fibrosis, intestinos inflamados y malnutrición).

Anticuerpos monoclonales y receptores

- 20 Un anticuerpo de longitud completa (“inmunoglobulina” o “Ig”) tal como existe de manera natural es una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas peptídicas, dos cadenas pesadas (H) (de aproximadamente 50-70 kDa cuando son de longitud completa) y dos cadenas ligeras (L) (de aproximadamente 25 kDa cuando son de longitud completa) interconectadas por puentes disulfuro. La parte amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos responsable principalmente del reconocimiento del antígeno. La parte carboxilo terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de una función efectora.
- 30 Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda y se caracterizan por una región constante particular. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada tipo de cadena pesada se caracteriza por una región constante particular.

Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (en el presente documento "HCVR") y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios (CH1, CH2, y CH3) para IgG, IgD e IgA; y 4 dominios (CH1, CH2, CH3 y CH4) para IgM e IgE. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (en el presente documento "LCVR") y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones HCVR y LCVR pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada HCVR y LCVR está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxilo-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es según convenciones bien conocidas [por ejemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]. La capacidad funcional de un anticuerpo para unirse a un antígeno particular está determinada colectivamente por las seis CDR. Sin embargo, incluso un único dominio variable que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno puede tener la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad inferior que un Fab completo.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales usando por ejemplo técnicas de hibridoma bien conocidas en la técnica, así como tecnologías recombinantes, tecnologías de presentación en fago, tecnologías sintéticas o combinaciones de tales tecnologías fácilmente conocidas en la técnica. El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. "Anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se deriva de una única copia o clon, incluyendo por ejemplo, cualquier clon eucariota, procariota o de fago, y no al método mediante el que se produce. Un "anticuerpo monoclonal" puede ser un anticuerpo intacto (completo o de longitud completa), un anticuerpo sustancialmente intacto, un fragmento funcional de un anticuerpo o puede ser un anticuerpo quimérico, anticuerpo humano o anticuerpo humanizado.

Una población de “anticuerpos monoclonales” se refiere a una población de anticuerpos homogénea o sustancialmente homogénea (o pura) (es decir, al menos aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, más
 5 preferiblemente al menos aproximadamente el 97% o el 98% o lo más preferiblemente al menos el 99% de los anticuerpos en la población son idénticos y competirían en un ensayo ELISA por el mismo antígeno o epítopo).

El término “se une específicamente” o “se une preferentemente” tal como se usa
 10 en el presente documento se refiere a la situación en la que un miembro de un par de unión específica no se une significativamente a moléculas distintas de su(s) pareja(s) de unión específica. El término también puede aplicarse cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención es específico para un epítopo particular que portan varios antígenos, en cuyo caso el
 15 anticuerpo específico que porta el dominio de unión a antígeno podrá unirse a los diversos antígenos que portan el epítopo.

La región Fc se refiere la parte de un anticuerpo intacto, por ejemplo, IgG, generada por digestión con la enzima papaína (véase la figura 1). La región Fc es un
 20 homodímero, estando compuesta cada cadena por una parte de la región bisagra así como los dominios CH2 y CH3. La región Fc es un dímero debido a los puentes disulfuro intercatenarios formados entre las regiones bisagra y múltiples enlaces no covalentes entre los dominios CH3. IgG es la clase más abundante de Ig en el cuerpo, constituyendo aproximadamente el 75% de la inmunoglobulina total
 25 y distribuida equitativamente dentro de los conjuntos intravascular y extravascular. Se produce muy poca IgG durante las fases tempranas de la respuesta primaria a un antígeno pero es la forma principal de anticuerpo producido durante la respuesta secundaria.

30 Tal como se describió anteriormente, los anticuerpos tienen regiones, principalmente las regiones CH2 y CH3, que participan en funciones distintas de la unión al antígeno. Conjuntamente, estas regiones y una parte de la secuencia de ligador se conocen generalmente como la región Fc, y tienen varias funciones efectoras mediadas por la unión de moléculas efectoras.

Las funciones efectoras mediadas por la región Fc del anticuerpo pueden dividirse en dos categorías: (1) funciones efectoras que funcionan tras la unión del anticuerpo a un antígeno (estas funciones implican, por ejemplo, la participación de la cascada del complemento o células que llevan receptor de Fc (FcR)); y (2) funciones efectoras que funcionan independientemente de la unión al antígeno (estas funciones confieren, por ejemplo, persistencia en la circulación y la capacidad para transferirse a través de barreras celulares mediante transcitos). Por ejemplo, la unión del componente C1q del complemento a anticuerpos activa el sistema del complemento. Tras la opsonización, la activación del complemento es importante en la lisis de patógenos celulares. La activación del complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede participar en la hipersensibilidad autoinmunitaria. Además, los anticuerpos se unen a células mediante la región Fc, con un sitio de unión a receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un FcR sobre una célula. Hay varios FcR que son específicos para diferentes clases de anticuerpo, incluyendo IgG, IgE, IgA e IgM. Aunque la presente invención no se limita a ningún mecanismo particular, la unión del anticuerpo a FcR sobre una superficie celular desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas incluyendo absorción y destrucción de partículas recubiertas con anticuerpos, aclaramiento de complejos inmunitarios, lisis de células diana recubiertas con anticuerpos por células citolíticas (ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulinas.

Varias funciones efectoras de anticuerpos están mediadas por FcR, que se unen a la región Fc de un anticuerpo. Los FcR se definen por su especificidad por isotipos de inmunoglobulinas; los receptores de Fc para anticuerpos de IgG se denominan Fc γ R, para IgE Fc ϵ R, para IgA Fc α R y así sucesivamente. Se han identificado tres subclases de Fc γ R: Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16).

Debido a que cada subclase de Fc γ R se codifica por dos o tres genes, y el corte y empalme alternativo del ARN conduce a múltiples transcritos, existe una amplia diversidad de isoformas de Fc γ R. Los tres genes que codifican para la subclase Fc γ RI (Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC) están agrupados en la región 1 q21.1 del brazo

largo del cromosoma 1; los genes que codifican para las isoformas de Fc γ RII (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC) y los dos genes que codifican para Fc γ RIII (Fc γ RIIIA y Fc γ RIIIB) están agrupados todos en la región 1q22. Estos diferentes subtipos de FcR se expresan en diferentes tipos de células (por ejemplo, Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991)). Por ejemplo, en seres humanos, Fc γ RIIIB se encuentra sólo en neutrófilos, mientras que Fc γ RIIIA se encuentra en macrófagos, monocitos, células NK y una subpoblación de células T. De manera notable, Fc γ RIIIA está presente en células NK, uno de los tipos de células implicadas en la ADCC.

10

El receptor Fc γ RIIIA humano (CD16) tiene un polimorfismo común en la posición 158 en su dominio extracelular que codifica para o bien una fenilalanina o bien una valina en esta posición. El alelo V de Fc γ RIIIA tiene afinidad superior por IgG1 humana que el alelo F. El alelo V158 también media en la ADCC más eficazmente. Datos clínicos han mostrado una correlación entre el genotipo de receptor Fc γ RIIIA en pacientes que se someten a tratamiento con Rituxan y la respuesta terapéutica. Se mostró que tanto las respuestas clínicas y moleculares como el tiempo hasta la progresión eran superiores en pacientes homocigotos para el genotipo Fc γ RIIIA-158V (aproximadamente el 20% de la población). En contraposición, pacientes heterocigotos u homocigotos para el genotipo Fc γ RIIIA-158F de afinidad inferior (aproximadamente el 80% de la población) responden peor. Estos datos sugieren que mutaciones de Fc que potencian la actividad de ADCC de los portadores de 158F podrían potenciar la eficacia clínica de la terapia del cáncer a base de anticuerpos. También está presente un polimorfismo genético en el receptor Fc γ RIIA humano (CD32) en la posición 131 en su dominio extracelular que codifica para o bien una histidina (H) o bien una arginina (R) en esta posición. Se ha encontrado que el polimorfismo en la posición 131 afecta a su capacidad para unirse a IgG humana. Datos recientes también muestran una correlación entre el polimorfismo en la posición 131 de Fc γ RIIA y la respuesta clínica a Rituxan. Pacientes homocigotos para el alelo H131 tenían una tasa de respuesta significativamente superior que los otros 2 grupos.

30

Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII son receptores de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF); Fc γ RI tiene tres dominios IgSF en su dominio extracelular, mientras que Fc γ RII y Fc γ RIII tienen sólo dos dominios IgSF en sus dominios extracelulares. Otro tipo de receptor de Fc es el receptor de Fc neonatal (FcRn). FcRn es estructuralmente similar al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y consiste en una cadena α unida no covalentemente a β 2-microglobulina.

Regiones Fc variantes

La presente invención proporciona polipéptidos variantes, secuencias de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos variantes y métodos para generar polipéptidos variantes. Preferiblemente, los polipéptidos variantes de la presente invención difieren de un polipéptido original por al menos una modificación de aminoácido, preferiblemente una sustitución de aminoácido. Un polipéptido "original", "de tipo natural", "de partida" o "no variante" comprende preferiblemente al menos una parte de una región Fc de anticuerpo y la sustitución de aminoácido en el polipéptido variante se produce dentro de la región Fc. Un polipéptido original que comprende una región Fc puede prepararse usando técnicas disponibles en la técnica para generar polipéptidos que comprenden una región Fc o parte de la misma. En realizaciones preferidas, el polipéptido original es un anticuerpo. Sin embargo, el polipéptido original puede ser cualquier otro polipéptido que comprenda al menos una parte de una región Fc (por ejemplo, una inmunoadhesina). La parte de la región Fc en el polipéptido original puede ser de una secuencia nativa o no nativa, preferiblemente es una secuencia nativa de origen humano. En determinadas realizaciones, puede generarse una región Fc variante (por ejemplo, según los métodos dados a conocer en el presente documento) y puede fusionarse a un polipéptido heterólogo de elección, tal como un dominio variable de anticuerpo o dominio de unión de un receptor o ligando, o cualquier polipéptido terapéutico.

En realizaciones preferidas, el polipéptido original comprende una región Fc o parte funcional de la misma. Generalmente, la región Fc del polipéptido original comprenderá una región Fc de secuencia nativa, y preferiblemente una región Fc de secuencia nativa humana. Sin embargo, la región Fc del polipéptido original pue-

de tener una o más alteraciones o modificaciones en la secuencia de aminoácidos preexistente (por ejemplo, una sustitución de aminoácido) con respecto a una región Fc de secuencia nativa. Por ejemplo, la actividad de unión a C1q de la región Fc puede haberse alterado previamente o la afinidad de unión a FcγR de la región Fc puede haberse alterado. La región Fc variante deseada o el ácido nucleico que codifica para la región Fc variante de interés puede construirse mientras que no está operativamente unida a la pareja de fusión deseada de la región Fc variante, (por ejemplo, una región variable de anticuerpo, una proteína heteróloga) y luego modificarse por ingeniería genética posteriormente para que esté operativamente unida a la misma. En realizaciones adicionales, la región Fc del polipéptido original es conceptual (por ejemplo, ideada o una representación visual en un ordenador o en papel) y, aunque no existe físicamente, el ingeniero de anticuerpos puede decidir sobre una secuencia de aminoácidos de la región Fc variante y generar un polipéptido que comprende esa secuencia o un ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos de la región Fc variante deseada. Sin embargo, en realizaciones preferidas, está disponible un ácido nucleico que codifica para una región Fc de un polipéptido original y esta secuencia de ácido nucleico se altera para generar una secuencia de ácido nucleico variante que codifica para la región Fc variante.

Puede prepararse ácido nucleico que codifica para una variante del polipéptido original (o simplemente una región Fc variante) mediante métodos conocidos en la técnica usando la orientación de la presente memoria descriptiva para secuencias particulares. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, la preparación mediante mutagénesis dirigida al sitio (o mediada por oligonucleótidos), mutagénesis por PCR (por ejemplo, Vallette *et al.*, Nuc. Acids Res. 17:723-733 (1989) y mutagénesis de casete (por ejemplo, Wells *et al.*, Gene 34:315-323 (1985) de un ácido nucleico preparado anteriormente que codifica para el polipéptido. La mutagénesis dirigida al sitio es un método preferido para preparar variantes. Esta técnica se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Carter *et al.* Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443 (1985) y Kunkel *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488 (1987)).

Alternativamente, o adicionalmente, puede determinarse la secuencia de aminoácidos deseada que codifica para un polipéptido variante, y puede generarse de manera sintética una secuencia de ácido nucleico que codifica para tal secuencia de aminoácidos del polipéptido variante (es decir, polipéptido que comprende una
 5 región Fc variante que comprende una sustitución de aminoácido tal como se describe en el presente documento). Esto se considera todavía que es una región Fc variante de una región Fc original aún cuando la región Fc original no era el precursor molecular de la región Fc variante sino en su lugar la secuencia de aminoácidos de la región Fc presente en el original en ausencia de la sustitución de
 10 aminoácido deseada.

La secuencia de aminoácidos del polipéptido original puede modificarse con el fin de generar una región Fc variante con afinidad o actividad de unión al receptor de Fc *in vitro* y/o *in vivo* alteradas; y/o actividad de ADCC alterada *in vitro* y/o *in vivo*;
 15 y/o actividad de CDC alterada *in vitro* y/o *in vivo*. La secuencia de aminoácidos del polipéptido original también puede modificarse con el fin de generar una región Fc variante con propiedades de unión al complemento y/o semivida en circulación alteradas.

20 Pueden lograrse modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas de la región Fc seleccionando sustituciones de aminoácidos que difieren significativamente en su efecto sobre la alteración de (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o
 25 el volumen de la cadena lateral, (d) la interacción con hidrato de carbono o (e) la flexibilidad del movimiento de dominios. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en clases basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes:

30 (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

5

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Sustituciones conservativas implicarán
10 intercambiar un miembro de una de estas clases por otro miembro de la misma clase.

Tal como se demuestra en los ejemplos a continuación, puede diseñarse por ingeniería genética una región Fc variante con actividad alterada (función/funciones
15 efectora(s) y/o farmacocinética). Por ejemplo, pueden modificarse uno o más residuos de aminoácido de la región Fc con el fin de alterar (por ejemplo, aumentar o disminuir) la actividad de ADCC o la actividad de CDC o la afinidad de unión a FcRn. En realizaciones preferidas, una modificación es una sustitución enumerada en la tabla 1 en el presente documento. Generalmente, se hará una sustitución
20 de aminoácido en uno o más de los residuos de la región Fc que se identifica en el presente documento que afectan a la actividad de ADCC con el fin de generar una región Fc variante de este tipo. En realizaciones preferidas, se sustituirán no más de uno a aproximadamente diez residuos de la región Fc. Las regiones Fc en el presente documento que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos
25 conservarán preferiblemente al menos aproximadamente el 80%, y preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, de la secuencia de región Fc original o de una secuencia de región Fc humana nativa.

30 Introduciendo la(s) modificación/modificaciones en la secuencia de aminoácidos apropiada(s) en una región Fc original, puede generarse una región Fc variante que (en comparación con la región Fc original) (a) media en la ADCC en presencia de células efectoras humanas más o menos eficazmente y/o (b) media en la CDC en presencia de complemento humano más o menos eficazmente y/o (c) se

une a C1q con una afinidad deseada y/o (d) se une a un receptor de Fc gamma (FcγR) o receptor de Fc neonatal (FcRn) con una afinidad deseada. Tales regiones Fc variantes comprenderán generalmente al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. Preferiblemente, la modificación es una sustitución de aminoácido, más preferiblemente una sustitución de aminoácido enumerada en las tablas 1-9 en el presente documento.

En realizaciones preferidas, la región Fc del polipéptido original es una región Fc humana o fragmento funcional de la misma, por ejemplo, una región Fc humana nativa de IgG1 (alotipos f y a,z), IgG2, IgG3, IgG4 humanas, y todos los alotipos conocidos o descubiertos de cualquier especie. Tales regiones tienen secuencias nativas tales como, por ejemplo, las mostradas en la figura 2 (SEQ ID NO:1-8), y la figura 3 (SEQ ID NO: 9-12) en el presente documento.

En determinadas realizaciones, con el fin de generar una región Fc variante con actividad de ADCC potenciada, el polipéptido original tiene preferiblemente actividad de ADCC preexistente (por ejemplo, el polipéptido original comprende una región Fc de IgG1 humana o IgG3 humana). En algunas realizaciones, una variante tiene actividad de ADCC potenciada (por ejemplo, mayores niveles en comparación con el original según un ensayo de ADCC descrito en el presente documento) en comparación con el polipéptido original, es decir, un anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante tiene actividad de ADCC potenciada tal como se compara en circunstancias idénticas con un anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original o una secuencia de región Fc de IgG1 o IgG3 nativa pero por lo demás idéntica al anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante.

En realizaciones preferidas, se introduce(n) sustitución/sustituciones de aminoácido(s) en los dominios CH2 y/o CH3 de una región Fc. En realizaciones preferidas, la región Fc original usada como molde para generar tales variantes comprende una región Fc de IgG humana.

En determinadas realizaciones, con el fin de generar una región Fc variante con actividad de CDC potenciada, el polipéptido original tiene preferiblemente activi-

- dad de CDC preexistente. En algunas realizaciones, una variante tiene actividad de CDC potenciada (por ejemplo, mayores niveles en comparación con el original según un ensayo de CDC descrito en el presente documento) en comparación con el polipéptido original, es decir, un anticuerpo monoclonal que comprende la
- 5 región Fc variante tiene actividad de CDC potenciada tal como se compara en circunstancias idénticas con un anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc original o una secuencia de región Fc de IgG1 o IgG3 nativa pero por lo demás idéntica al anticuerpo monoclonal que comprende la región Fc variante.
- 10 Los polipéptidos variantes descritos en el presente documento pueden someterse a modificaciones adicionales, dependiendo del uso deseado o previsto del polipéptido. Tales modificaciones pueden implicar, por ejemplo, una alteración adicional de la secuencia de aminoácidos (sustitución, inserción y/o delección de residuos de aminoácido), modificaciones con hidratos de carbono, fusión a polipépti-
- 15 do(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes. Tales modificaciones adicionales pueden hacerse antes de, simultáneamente con o después de la(s) modificación/modificaciones de aminoácido(s) dada(s) a conocer en el presente documento que da(n) como resultado una alteración de la unión al receptor de Fc y/o actividad de ADCC y/o actividad de CDC.
- 20 Alternativa o adicionalmente, puede ser útil combinar modificaciones de aminoácidos con una o más modificaciones de aminoácidos adicionales que alteran la unión a C1q y/o la función de CDC de la región Fc. Por ejemplo, el polipéptido de partida puede ser incapaz de unirse a C1q y/o mediar en la CDC y puede modifi-
- 25 carse según las enseñanzas en el presente documento de manera que adquiere estas funciones efectoras adicionales. Además, pueden modificarse polipéptidos con actividad de unión a C1q preexistente, opcionalmente que tienen además la capacidad para mediar en la CDC, de manera que una o ambas de estas actividades se potencian (o alternativamente, se disminuyen). Se describen en el pre-
- 30 sente documento determinadas modificaciones de aminoácidos en la región Fc que alteran la unión a C1q y/o modifican la actividad de CDC (véanse las tablas 2, 7, 8 y 10) y, por ejemplo, en el documento W00042072.

Tal como se dio a conocer anteriormente, puede diseñarse una región Fc o parte de la misma con función efectora alterada, por ejemplo, modificando la actividad de CDC y/o la actividad de ADCC. Por ejemplo, puede generarse una región Fc variante con actividad de CDC mejorada y actividad de ADCC mejorada. Alternativamente, cuando se desea que una función efectora se reduzca o se suprima, puede diseñarse por ingeniería genética una región Fc variante con actividad de CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras realizaciones, puede aumentarse sólo una de estas actividades, y opcionalmente también reducirse la otra actividad, por ejemplo, para generar una región Fc variante con actividad de ADCC mejorada, pero actividad de CDC reducida y viceversa. Adicionalmente, puede diseñarse por ingeniería genética una región Fc variante con afinidad de unión modificada a FcRn, proteína A y/u otras proteínas de unión a Fc.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden una variante de un polipéptido original, en las que el original comprende una región Fc (o parte de la misma) y en las que la variante comprende al menos una modificación de aminoácido de residuos de superficie dentro de la región Fc (véase, por ejemplo, Deisenhofer, *Biochemistry*, 20:2361-70, abril de 1981, y documento W00042072). En otras realizaciones, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden una variante de un polipéptido original que tiene una región Fc, en las que la variante comprende al menos una modificación de aminoácido de residuos de superficie en la región Fc. En realizaciones adicionales, la presente descripción comprende una variante de un polipéptido original que tiene una región Fc, comprendiendo la variante al menos una modificación de aminoácido de superficie y al menos una modificación de aminoácido no de superficie, ambas en la región Fc.

Variantes de combinación

En algunas realizaciones, una región Fc variante comprende dos o más modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones). Tales variantes de combinación pueden producirse, por ejemplo, seleccionando dos o más de las sustituciones de aminoácidos detalladas anteriormente (por ejemplo, véase la tabla 1), o una o más sustituciones de aminoácidos enumeradas en la tabla 1 además de una sustitución conocida en la técnica.

- Las variantes de combinación mostradas en la tabla 10 y otras variantes de combinación (tales como las sustituciones dadas conocer en el documento W00042072 usadas en combinación con las dadas a conocer en el presente documento) pueden someterse a prueba para determinar una actividad dada (por ejemplo, actividad de unión a FcRn, actividad de ADCC y actividad de CDC) en una variedad de ensayos (véanse los ejemplos a continuación). En este sentido, pueden identificarse variantes de combinación útiles.
- En determinadas realizaciones preferidas, las múltiples sustituciones de aminoácidos presentes en una región Fc variante tienen una sustitución de aminoácido que aumenta la actividad de ADCC, y una modificación de aminoácido que aumenta la afinidad de unión a receptor de Fc neonatal (FcRn) (por ejemplo, a pH 6,0) del polipéptido que comprende la región Fc variante. En otras realizaciones, las variantes de combinación tienen un aminoácido de superficie en una región Fc variante de la presente invención, y una modificación de aminoácido de no superficie. Pueden generarse variantes de combinación adicionales en las regiones Fc variantes de la presente invención combinando dos o más de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento, o al menos una de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento con las descritas en, por ejemplo, el documento W00042072.

Ensayos de polipéptidos variantes

- La presente descripción proporciona diversos ensayos para seleccionar regiones Fc variantes o polipéptidos que comprende una región Fc variante. Pueden usarse ensayos de selección para encontrar o confirmar variantes útiles. Por ejemplo, pueden seleccionarse variantes de combinación (véase, por ejemplo, la tabla 10) para encontrar variantes con unión a FcR alterada, y/o actividad de ADCC alterada y/o de CDC alterada (por ejemplo, actividad de ADCC o CDC aumentada o disminuida) y/o capacidad modificada para agotar células diana (células B, por ejemplo) a partir de sangre completa. Además, tal como se describe a continuación, los ensayos pueden emplearse para encontrar o confirmar variantes que tienen actividad terapéutica beneficiosa en un sujeto (por ejemplo, tal como un ser humano con síntomas de una enfermedad sensible a anticuerpos o inmunoad-

hesinas). Puede emplearse una variedad de tipos de ensayo para evaluar cualquier cambio en una variante en comparación con el polipéptido original (ensayos de selección proporcionados por ejemplo en el documento W00042072). Se describen a continuación ensayos a modo de ejemplo adicionales.

5

En realizaciones preferidas, un polipéptido variante (es decir, polipéptido que comprende una región Fc variante o parte funcional de la misma) es un anticuerpo monoclonal que conserva esencialmente la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (mediante una región de unión a antígeno no modificada o región de unión a antígeno modificada) en comparación con el polipéptido original (por ejemplo, la capacidad de unión es preferiblemente menos de 20 veces, 10 veces, 7 veces o menos de aproximadamente 5 veces diferente de la del polipéptido original). La capacidad de unión del polipéptido variante al antígeno puede determinarse usando técnicas tales como ELISA, análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA), por ejemplo pueden emplearse ensayos de unión a FcR para evaluar las variantes de la presente invención. Por ejemplo, puede medirse la unión a receptores de Fc tales como Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb, Fc γ RIII, FcRn, etc., titulando un polipéptido variante y midiendo el polipéptido variante unido usando un anticuerpo que se une al polipéptido variante en un formato de ELISA (véanse los ejemplos a continuación). Por ejemplo, puede seleccionarse una variante que comprende un anticuerpo en un ensayo ELISA convencional para determinar la unión a un FcRn a pH 6,0 y pH 7,0 o pH 7,4. Puede usarse una superficie sólida recubierta con estreptavidina o neutravidina para capturar FcRn marcado con biotina de cualquier especie, tal como ratón o ser humano. Tras bloquear, el receptor de captura puede incubarse con polipéptidos variantes (por ejemplo, anticuerpos) diluidos en tampones a pH 6,0 o pH 7,0. En la siguiente etapa, se añade una molécula específica para anticuerpos humanos (por ejemplo, (Fab')₂ de cabra anti-Fab humano conjugado con una enzima). Después de eso, puede añadirse un sustrato con el fin de determinar la cantidad de unión del polipéptido variante al FcRn inmovilizado a pH 6,0 o pH 7,0 o pH 7,4. Los resultados de este ensayo pueden compararse con la capacidad del polipéptido original (no variante) para unirse al mismo FcR. En otras realizaciones preferidas, los componentes para llevar a cabo un ELISA (por ejemplo, con FcRn)

para seleccionar variantes están envasados en un kit (por ejemplo, con instrucciones para su uso).

También puede emplearse un ensayo de ADCC para seleccionar las variantes.

- 5 Los ensayos de ADCC pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*. Para evaluar la actividad de ADCC de un polipéptido variante, puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro* usando razones de efector:diana variables. Un ensayo de ADCC a modo de ejemplo podría usar una línea celular diana que expresa cualquiera de los siguientes antígenos diana: CD20, CD22, CD33, CD40, CD63, receptor de EGF, receptor
- 10 her-2, antígeno de membrana específico de la próstata, hidrato de carbono de Lewis Y, gangliósidos GD2 y GD3, lamp-i, CO-029, L6 y ephA2. Pueden obtenerse células efectoras de un donante sano (por ejemplo, el día del experimento) y PBMC purificadas usando Histopaque (Sigma). Entonces se incuban previamente las células diana con una IgG que comprende una región Fc variante de la inven-
- 15 ción a, por ejemplo, 0,1 - 1.000 ng/ml durante aproximadamente 30 minutos antes de mezclar con células efectoras a razones de efector:diana de, por ejemplo, 40:1, 20:1 y 10:1. Entonces puede medirse la actividad de ADCC colorimétrica-mente usando un kit de detección de citotoxicidad (Roche Molecular Biochemi-
- 20 cals) para la cuantificación de la lisis y muerte celular basándose en la medición de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) liberada del citosol de células daña-das al sobrenadante. La actividad de ADCC también puede medirse, para ensa-yos de células diana cargadas con cromo, midiendo la liberación de cromo 51 re-sultante. Puede determinarse la citotoxicidad celular independiente de anticuerpos midiendo la actividad LDH de células efectoras y diana en ausencia de anticuerpo.
- 25 Puede medirse la liberación total tras la adición de Triton X-100 al 1% a la mezcla de células efectoras y diana. La incubación de las células efectoras y diana puede realizarse durante un periodo de tiempo optimizado (0,54-18 horas) a 37°C en un 5,0% de CO₂ y al que luego le sigue la centrifugación de las placas de ensayo. Los sobrenadantes pueden transferirse entonces a placas de 96 pocillos e incu-
- 30 barse con reactivo de detección de LDH durante 30 minutos a 25°C. Entonces puede medirse la absorbancia de la muestra a 490 nm usando un lector de micro-placas. Entonces puede calcularse el porcentaje de citotoxicidad usando la si-guiente ecuación: % de citotoxicidad = valor experimental - control bajo/control al-to - control bajo X 100%. Entonces puede compararse el porcentaje de citotoxici-

dad de anti-CD20 y variantes directamente con una cantidad igual de RITUXAN para proporcionar una medición de la eficacia relativa. Un ensayo de ADCC a modo de ejemplo podría emplear células SKW6.4 que sobreexpresan el antígeno CD20 (por ejemplo, adquiridas de la Colección Americana de Cultivos Tipo) como
5 fuente de células diana. Se conocen en la técnica muchas variaciones de este ensayo (por ejemplo, Zuckerman *et al.*, CRC Crit Rev Microbiol 1978; 7(1):1-26).

Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, células NK, macrófagos y otras PBMC. Alternativamente, o adicionalmente, puede
10 evaluarse la actividad de ADCC de los polipéptidos variantes de la presente invención *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el dado a conocer en Clynes *et al.* PNAS (USA) 95:652-656 (1998)).

Las variantes también pueden seleccionarse para determinar la activación del
15 complemento. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC (véase, por ejemplo, Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods, 202:163 (1996)). Por ejemplo, pueden diluirse con tampón diversas concentraciones del polipéptido variante y complemento humano. Pueden diluirse células que expresan el antígeno al que se une el polipéptido variante hasta una densidad
20 de 1×10^6 células/ml. Pueden añadirse mezclas de polipéptido variante, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano y dejarse incubar durante 2 horas a 37°C y un 5% de CO₂ para facilitar la lisis celular mediada por complemento. Entonces pueden añadirse cincuenta microlitros de azul de alamar (Accumed International) a
25 cada pocillo e incubarse durante la noche a 37°C. Puede medirse la absorbancia usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Pueden expresarse los resultados en unidades relativas de fluorescencia (URF). Pueden calcularse las concentraciones de la muestra a partir de una curva patrón y puede notificarse el porcentaje de actividad en comparación con polipéptido no
30 variante para el polipéptido variante de interés.

En determinadas realizaciones, los polipéptidos variantes no activan el complemento o activan el complemento de manera escasa. Por ejemplo, un polipéptido variante presenta una actividad de CDC de aproximadamente el 0-10% en este

- ensayo en comparación con un anticuerpo control que tiene una región Fc de IgG1 no mutada. Preferiblemente, la variante no parece tener ninguna actividad de CDC (por ejemplo, por encima del fondo) en el ensayo de CDC anterior. En otras realizaciones, se encuentra que un polipéptido variante de la presente invención tiene CDC potenciada en comparación con un polipéptido original (por ejemplo, que presenta preferiblemente una potenciación de aproximadamente 1,1, 1,5, 1,7 o 2 veces a aproximadamente 100 veces (o más) en la actividad de CDC *in vitro* o *in vivo* cuando se comparan los valores de CI_{50}).
- 10 También pueden seleccionarse polipéptidos variantes para determinar el agotamiento de células diana en un ensayo de sangre completa. Por ejemplo, pueden seleccionarse diversas concentraciones del polipéptido variante con especificidad de diana de CD20 para determinar el agotamiento de células B en un ensayo de sangre completa usando FACS (Vugmeyster *et al.*, 2003 Cytometry 52A, 101-109). Se incuba sangre recién extraída con concentraciones variables de polipéptido variante a 37°C y un 5% de CO₂ durante 4 horas (el tiempo puede variar). Tras la incubación, se lisan los glóbulos rojos según las directrices del fabricante con un reactivo de cloruro de amonio (Beckton-Dickinson, n.º de cat. 555899) y se detectan células B mediante FACS usando un anticuerpo marcado fluorescentemente específico para células B (anti-CD 19, por ejemplo). Los resultados pueden expresarse como porcentaje del agotamiento de células B en relación con o bien una muestra no tratada o bien una muestra incubada con un anticuerpo irrelevante (que no se agota).
- 25 En realizaciones preferidas, un polipéptido variante agota células B más eficazmente que el polipéptido original. Un polipéptido variante puede agotar células B, por ejemplo, en un grado de aproximadamente dos veces o más que el polipéptido original, y preferiblemente de manera aproximada cinco veces o más. Además, una variante puede presentar una mayor potencia en el agotamiento de células B.
- 30 Por ejemplo, una variante puede agotar el mismo porcentaje de células B en relación con el polipéptido original, pero utilizar aproximadamente cinco veces menos, y preferiblemente de manera aproximada 10 veces menos de anticuerpo. El agotamiento de células diana mediado por variantes puede estar de aproximadamente 2 veces, 3 veces, 5 veces a aproximadamente 1000 veces o más, y preferible-

mente de desde aproximadamente 5 veces hasta aproximadamente 1000 veces mejorado en comparación con el polipéptido original.

Las variantes también pueden seleccionarse *in vivo*. Puede emplearse cualquier tipo de ensayo *in vivo*. Se proporciona a continuación un ejemplo particular de un tipo de ensayo. Este ensayo a modo de ejemplo permite la evaluación preclínica de variantes de Fc *in vivo*. Una variante que va a someterse a prueba puede incorporarse en la región Fc de un anticuerpo particular que se sabe que tiene alguna actividad. Por ejemplo, una variante puede incorporarse en la región Fc de una IgG anti-CD20 mediante mutagénesis. Esto permite que se comparen una IgG original y una IgG de variante de Fc directamente con RITUXAN (que se sabe que promueve regresión tumoral). La evaluación preclínica puede realizarse en 2 fases (una fase farmacocinética y una fase farmacodinámica). El objetivo de los estudios farmacocinéticos de fase I es determinar si hay diferencias en la velocidad de aclaramiento entre una IgG de variante de Fc y el anticuerpo con actividad *in vivo* conocida (por ejemplo, RITUXAN). Diferencias en la velocidad de aclaramiento pueden provocar diferencias en el nivel en estado estacionario de IgG en suero. Como tal, si se detectan diferencias en las concentraciones en estado estacionario, éstas deben normalizarse para permitir que se hagan comparaciones precisas. El objetivo de los estudios farmacodinámicos de fase II es determinar el efecto de las mutaciones de Fc sobre, en este caso, el crecimiento tumoral. Estudios previos con RITUXAN usaron una única dosis que inhibió completamente el crecimiento tumoral. Debido a que esto no permite que se midan diferencias cuantitativas, debe emplearse un intervalo de dosis.

25

Puede realizarse la comparación farmacocinética de fase I de una variante de Fc, la Fc original de tipo natural y RITUXAN, por ejemplo, de la siguiente manera. En primer lugar, pueden inyectarse 40 µg (u otra dosis que va a someterse a prueba) por animal por vía intravenosa y cuantificarse el nivel en plasma de la IgG a las 0, 0,25, 0,5, 1, 24, 48, 72, 96, 120, 168 y 336 h. Los datos pueden ajustarse, por ejemplo, usando un programa farmacocinético (WinNonLin) usando un modelo farmacocinético de dos compartimentos de latencia cero para obtener la velocidad de aclaramiento. La velocidad de aclaramiento puede usarse para definir el nivel en plasma en estado estacionario con la siguiente ecuación: $C = \text{dosis} / (\text{velocidad}$

de aclaramiento $\times t$), en la que T es el intervalo entre dosis y C es el nivel en plasma en estado estacionario. Pueden realizarse experimentos farmacocinéticos en ratones que no llevan tumor con, por ejemplo, un mínimo de 5 ratones por punto de tiempo.

5

Puede emplearse un modelo animal para la siguiente fase de la siguiente manera. En el flanco derecho de ratones CB17-SCID pueden implantarse 10^6 células Raji por vía subcutánea. El bolo intravenoso del anticuerpo con Fc variante, el anticuerpo con Fc de tipo natural y RITUXAN puede comenzar inmediatamente tras la
 10 implantación y continuar hasta que el tamaño tumoral es mayor de 2 cm de diámetro. El diámetro tumoral puede determinarse cada lunes, miércoles y viernes midiendo la longitud, anchura y profundidad del tumor usando un calibre (volumen tumoral = $A \times L \times P$). Un gráfico del volumen tumoral frente al tiempo proporcionará la velocidad de crecimiento tumoral para el cálculo farmacodinámico. Debe
 15 usarse un mínimo de aproximadamente 10 animales por grupo.

La comparación farmacodinámica de fase II del anticuerpo con Fc variante, el anticuerpo con Fc de tipo natural y RITUXAN puede realizarse de la siguiente manera. Basándose en datos publicados, RITUXAN a $10 \mu\text{g/g}$ semanalmente inhibió
 20 completamente el crecimiento tumoral tumor *in vivo* (Clynes *et al.*, Nat. Med. 6:443-6, 2000). Por tanto, puede someterse a prueba un intervalo de dosis semanal de $10 \mu\text{g/g}$, $5 \mu\text{g/g}$, $1 \mu\text{g/g}$, $0,5 \mu\text{g/g}$ y $0 \mu\text{g/g}$. El nivel en plasma en estado estacionario al que se inhibe la velocidad de crecimiento tumoral en un 50% puede determinarse gráficamente mediante la relación entre el nivel en plasma en esta-
 25 do estacionario y la eficacia. El nivel en plasma en estado estacionario puede calcularse tal como se describió anteriormente. Si es necesario, puede ajustarse τ en consecuencia para cada anticuerpo con Fc variante y el anticuerpo con Fc de tipo natural dependiendo de sus propiedades farmacocinéticas para lograr un nivel en plasma en estado estacionario comparable a RITUXAN. Valores farmacodinámicos mejorados estadísticos del anticuerpo con Fc variante en comparación con el
 30 polipéptido original (por ejemplo, anticuerpo con Fc de tipo natural) y RITUXAN indicarán generalmente que el anticuerpo con Fc variante confiere una actividad *in vivo* mejorada.

- Puede realizarse una comparación farmacodinámica adicional de anticuerpos con Fc variante, anticuerpos con Fc de tipo natural y RITUXAN en monos cynomolgus tal como se describió previamente (Reff *et al.*, Blood 83, 435-445, 1994).
- 5 Puede usarse una respuesta a la dosis para el agotamiento de células B periféricas y células B de ganglios linfáticos para comparar las potencias relativas de las variantes de Fc con Fc de tipo natural y RITUXAN administrados por vía intravenosa y/o por vía subcutánea. Valores farmacodinámicos mejorados estadísticos de la variante de Fc en comparación con el polipéptido original (por ejemplo, Fc
- 10 de tipo natural) y RITUXAN indicarán generalmente que el anticuerpo con Fc variante confiere una actividad *in vivo* mejorada.

- En realizaciones adicionales, las variantes (es decir, polipéptido que comprende una región Fc variante de la invención, o parte funcional de la misma) se seleccionan de manera que se identifican variantes que son útiles para uso terapéutico
- 15 en al menos dos especies. Tales variantes se denominan en el presente documento "variantes mejoradas de doble especie", y son particularmente útiles para identificar variantes que son terapéuticas en seres humanos, y también demuestran (o es probable que demuestren) eficacia en un modelo animal. En este sentido,
- 20 la presente invención proporciona métodos para identificar variantes que tienen una fuerte probabilidad de aprobarse para pruebas clínicas en seres humanos puesto que es probable que los datos de modelos animales apoyen cualquier solicitud de pruebas en seres humanos realizada a agencias reguladoras gubernamentales (por ejemplo, la Food and Drug Administration estadounidense).

25

- En determinadas realizaciones, se identifican variantes mejoradas de doble especie realizando en primer lugar un ensayo de ADCC usando células efectoras humanas para encontrar variantes mejoradas, y realizando entonces un segundo ensayo de ADCC usando células efectoras de ratón, rata o primate no humano
- 30 para identificar un subconjunto de las variantes mejoradas que son variantes mejoradas de doble especie. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos para identificar variantes mejoradas de doble especie que comprenden: a) proporcionar: i) células diana, ii) una composición que comprende una variante candidata de un polipéptido original que tiene al menos una parte de una

región Fc, en la que la variante candidata comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc, y en la que la variante candidata media en la citotoxicidad de células diana en presencia de una primera especie (por ejemplo, ser humano) de células efectoras más eficazmente que el polipéptido original, y iii) células efectoras de una segunda especie (por ejemplo, ratón, rata o primate no humano), y b) incubar la composición con las células diana en condiciones tales que la variante candidata se une a las células diana generando de ese modo células diana unidas a la variante candidata, c) mezclar las células efectoras de la segunda especie con las células diana unidas a la variante candidata, y d) medir la citotoxicidad de células diana mediada por la variante candidata.

En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa e) determinar si la variante candidata media en la citotoxicidad de células diana en presencia de las células efectoras de la segunda especie más eficazmente que el polipéptido original. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa f) identificar una variante candidata como una variante mejorada de doble especie que media en la citotoxicidad de células diana en presencia de las células efectoras de la segunda especie más eficazmente que el polipéptido original. En realizaciones preferidas, las variantes de doble especie identificadas se seleccionan entonces *in vivo* en uno o más ensayos en animales.

En determinadas realizaciones, se identifican variantes mejoradas de doble especie realizando en primer lugar un ensayo en sangre completa usando sangre humana para encontrar variantes mejoradas y luego realizando un segundo ensayo en sangre completa usando sangre de ratón, rata o primate no humano para identificar un subconjunto de las variantes mejoradas que son variantes mejoradas de doble especie. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para identificar variantes mejoradas de doble especie, que comprenden: a) proporcionar: i) células diana, ii) una composición que comprende una variante candidata de un polipéptido original que tiene al menos una parte de una región Fc, en la que la variante candidata comprende al menos una sustitución de aminoácido en la región Fc, y en la que la variante candidata media en el agotamiento de células diana en presencia de sangre de una primera especie (por ejemplo, ser humano) más eficazmente que el polipéptido original, y iii) sangre de

una segunda especie (por ejemplo, ratón, rata o primate no humano), y b) incubar la composición con las células diana en condiciones tales que la variante candidata se une a las células diana generando de ese modo células diana unidas a la variante candidata, c) mezclar la sangre de la segunda especie con las células diana unidas a la variante candidata, y d) medir el agotamiento de células diana mediado por la variante candidata. En determinadas realizaciones, el método comprende además la etapa e) determinar si la variante candidata media en el agotamiento de células diana en presencia de la sangre de la segunda especie más eficazmente que el polipéptido original. En algunas realizaciones, el método

5 comprende además la etapa f) identificar una variante candidata como una variante mejorada de doble especie que media en el agotamiento de células diana en presencia de la sangre de la segunda especie más eficazmente que el polipéptido original. En realizaciones preferidas, las variantes de doble especie identificadas se seleccionan entonces *in vivo* en uno o más ensayos en animales.

15

En determinadas realizaciones, se identifican variantes mejoradas de doble especie realizando cualquiera de los ensayos anteriores usando componentes humanos (por ejemplo, células humanas, FcR humano, etc.) para identificar variantes mejoradas, y luego realizando el mismo ensayo (o un ensayo diferente) con componentes de animales no humanos (por ejemplo, células de ratón, FcR de ratón, etc.). En este sentido, puede identificarse un subconjunto de variantes que tienen un buen rendimiento según criterios dados en tanto ensayos basados en seres humanos como ensayos basados en una segunda especie.

25 Un procedimiento a modo de ejemplo para identificar variantes mejoradas de doble especie es tal como sigue. En primer lugar, se muta una secuencia de ácido nucleico que codifica para al menos una parte de una región Fc de IgG de manera que la secuencia de aminoácidos expresada tiene al menos un cambio de aminoácido, generando de ese modo una variante. Esta variante de IgG expresada

30 se caracteriza entonces en un ensayo de ADCC usando PBMC humanas o un subconjunto (células NK o macrófagos, por ejemplo). Si se encuentra actividad de ADCC potenciada, entonces se selecciona la variante en un segundo ensayo de ADCC usando PBMC de ratón o rata. Alternativamente, o además, puede realizarse un ensayo con la variante para unirse a líneas celulares o receptores de

roedores clonados. Finalmente, si se encuentra que la variante mejora en el segundo ensayo, lo que la convierte en una variante mejorada doble, entonces la variante se selecciona *in vivo* en ratones o ratas.

5 Moléculas que contienen regiones Fc variantes a modo de ejemplo

La regiones Fc variantes pueden ser parte de moléculas más grandes. Las moléculas más grandes pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, inmunoadhesinas, etc. Adicionalmente, una región Fc variante puede estar operativamente unida a un polipéptido distinto de anticuerpo al que le puede conferir una semivida alterada (aumentada o disminuida). Como tal, es evidente que existe una amplia gama de aplicaciones para las regiones Fc variantes.

15 Anticuerpos que contienen regiones Fc variantes

En realizaciones preferidas, la molécula que contiene regiones Fc variantes (por ejemplo, polipéptido) es un anticuerpo. A continuación se describen técnicas para producir anticuerpos.

20 (i) Selección y preparación del antígeno

Generalmente, cuando la molécula que contiene regiones Fc variantes es un anticuerpo, el anticuerpo se dirige contra antígeno de interés. Preferiblemente, el antígeno es un polipéptido y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de una disminución en la cantidad o la actividad de la molécula antigénica puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también pueden emplearse anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos glicolipídicos asociados a tumor; véase la patente estadounidense 5.091.178).

Los antígenos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como renina; una hormona de crecimiento, incluyendo hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovina; factor liberador de hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-i-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de

coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular (TF) y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA) o de orina humana; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulador por activación de células T expresadas y secretadas normalmente); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa); una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como beta-lactamasa; ADNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos tal como un FGF y FGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF beta, incluyendo TGF-1, TGF-2, TGF-3, TGF-4 o TGF-5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des (1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un factor de diferenciación del crecimiento (por ejemplo, GDF8); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-25; superóxido dismutasa; receptores celulares T-25; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración de la descomposición; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la envuelta del SIDA; proteínas de transporte; receptores de direccionamiento; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como receptor HER2, HER3 o HER4; grelina; un miembro de una ruta de apoptosis; y fragmentos o precursores de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

Los antígenos preferidos incluyen, pero no se limitan a, proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia del receptor de ErbB tal como el receptor de EGF, el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, MacI, p 150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, integrina $\alpha 4/\beta 7$ e integrina $\text{Xv}/\beta 3$ que incluye o bien 5 o bien subunidades de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; factor tisular (TF); interferón alfa (α -IFN); factores de diferenciación del crecimiento, por ejemplo, GDF-8; una interleucina, tal como IL-8; IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor de *flk2/flt3*; receptor de obesidad (OB); receptor de *mpl*; CTLA-4; proteína C y grelina.

Pueden usarse antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembrana, tales como receptores, pueden usarse fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Alternativamente, pueden usarse células que expresan la molécula transmembrana como inmunógeno. Tales células pueden derivarse de una fuente natural (por ejemplo, líneas de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para el experto en la técnica.

(ii) Anticuerpos policlonales

25

La presente descripción proporciona anticuerpos policlonales con regiones Fc variantes. Por ejemplo, un repertorio de inmunoglobulina humana que contiene regiones constantes de IgG1 modificadas puede transplantarse a ratones con inmunoglobulinas inactivadas, dando como resultado ratones que expresan un repertorio de IgG que contiene regiones Fc modificadas (véase, por ejemplo, Mendez, MJ *et al.*, *Nature Genetics* 15:146 (1997)). Se generan anticuerpos policlonales preferiblemente en animales mediante inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) múltiples del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante con una proteína que es inmunogénica en la especie que va a

inmunizarse (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja) usando un agente bifuncional o de derivatización (por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsulfosuccinimida para la conjugación a través de residuos de cisteína, N-hidroxisuccinimida para la conjugación a través de residuos de lisina, glutaraldehído, anhídrido succínico, SOC12, o $R_1N=C=NR$, en el que R y R₁ son grupos alquilo diferentes.

Ejemplos de un protocolo de inmunización general para un conejo y un ratón son tal como siguen. Se inmunizan los animales frente al antígeno, los conjugados inmunogénicos o los derivados combinando, por ejemplo, 100 µg o 5 µg de la proteína o el conjugado (por ejemplo, para un conejo o un ratón respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde se refuerzan los animales con 1/5 o 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde se extrae sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para determinar el título de anticuerpos. Se refuerzan los animales hasta la meseta del título. Preferiblemente, se refuerza al animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

25 (iii) Anticuerpos monoclonales

La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales con regiones Fc variantes. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales de varias maneras, incluyendo el uso del método del hibridoma (por ejemplo, tal como se describe por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495, 1975), o mediante métodos de ADN recombinante (por ejemplo, patente estadounidense No. 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster o un macaco, para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada

para la inmunización. Alternativamente, pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Entonces se fusionan linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan la producción de anticuerpo de alto nivel estable por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre ellas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-1 I disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland EE.UU. También se han descrito líneas de células de mieloma humanas y de heteromieloma de ratón-humanas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (por ejemplo, Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)).

Se somete a prueba medio de cultivo en el que están haciéndose crecer células de hibridoma para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como RIA o ELISA. Tras identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos de dilución limitante y hacerse crecer mediante métodos convencionales. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden hacerse

crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica para los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencional (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, puede colocarse el ADN en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describe con más detalle a continuación.

En algunas realizaciones, se aíslan anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de fagos de anticuerpo generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, Nature, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando bibliotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks *et al.*, BioTechnology, 10: 779-783 (1992)), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (por ejemplo, Waterhouse *et al.*, Nuc. Acids. Res., 21: 2265-2266 (1993)). Por tanto, estas técnicas y técnicas similares son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales bien conocidas en la técnica para el aislamiento de anticuerpos monoclonales. Además, puede modificarse el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (por ejemplo, patente estadounidense n.º 4.816.567, y

Morrison, *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci USA, 81: 6851 (1984), o uniendo covalentemente a la secuencia que codifica para inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido distinto de inmunoglobulina.

- 5 Normalmente tales polipéptidos distintos de inmunoglobulina se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene
10 especificidad por un antígeno diferente.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

- La presente descripción proporciona anticuerpos humanizados y humanos con
15 regiones Fc variantes. En realizaciones preferidas, un anticuerpo humanizado comprende secuencias de aminoácidos de anticuerpo humano junto con residuos de aminoácido que no son de un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, las secuencias humanas en un anticuerpo humanizado comprenden las regiones de entramado ("FR") y las secuencias o residuos que no son de un anticuerpo
20 humano comprenden una o más CDR. Merece la pena indicar que las FR y las CDR pueden definirse basándose en la numeración de residuos de aminoácido en las regiones pesada y VL. Se pretende que el término CDR signifique los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de polipéptidos de cadena tanto pesada como ligera. Estas regiones se han defi-
25 nido por Kabat *et al.* (J. Biol. Chem. 252: 6609-6616 (1977) y Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest (1991); "Kabat", Chothia *et al.* (J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); "Chothia" y MacCallum *et al.* (J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996); "MacCallum", en los que las definiciones incluyen residuos de aminoácido solapantes o subconjuntos de residuos de aminoácido cuando se compara-
30 ran entre sí. No obstante, se pretende que la aplicación de cualquiera de estas definiciones, solas (por ejemplo, la definición de Kabat) o en combinación (únicamente a modo de ejemplo, la definición combinada de Kabat y Chothia) para referirse a una CDR de un anticuerpo (incluyendo un anticuerpo humanizado) esté

dentro del alcance del término tal como se define y se usa en el presente documento.

- Además, se pretende que el término “entramado”, cuando se usa en referencia a una región variable de anticuerpo, signifique todos los residuos de aminoácido fuera de las regiones CDR dentro de la región variable de un anticuerpo. Por tanto, un entramado de región variable tiene aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud pero se pretende que haga referencia únicamente a los aminoácidos fuera de las CDR. Se pretende que el término “región de entramado” signifique cada dominio del entramado que está separado por las CDR. Por tanto, para el ejemplo específico de una región VH y para las CDR tal como se definen por Kabat, región de entramado 1 (FR1) corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 1-30; región de entramado 2 (FR2) corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 36-49; región 3 (FR3) corresponde al dominio de la región variable que abarca los aminoácidos 66-94, y región 4 (FR4) corresponde al dominio de la región variable desde el aminoácido 103 hasta el final de la región variable. Las FR para la cadena ligera están separadas de manera similar por cada una de las CDR de región variable de cadena ligera. De manera similar, usando la definición de CDR de Chothia o MacCallum, o cualquier combinación de definiciones de CDR, los límites de entramado están separados por los extremos terminales de CDR respectivas tal como se describió anteriormente. A pesar de las múltiples definiciones de CDR, en algunas realizaciones se prefiere usar la definición de Kabat para definir las CDR.
- Los residuos en un anticuerpo humanizado que no son de un anticuerpo humano pueden ser residuos o secuencias importados de, o derivados de, otra especie (incluyendo, pero sin limitarse a, ratón), o estas secuencias pueden ser secuencias de aminoácidos al azar (por ejemplo, generadas a partir de secuencias de ácido nucleico aleatorizadas), que se insertan en la secuencia de anticuerpo humanizado. Tal como se indicó anteriormente, las secuencias de aminoácidos humanas en un anticuerpo humanizado son preferiblemente las FR, mientras que los residuos que no son de un anticuerpo humano (tanto si se derivan de otra especie como si son secuencias de aminoácidos al azar) corresponden preferiblemente a las CDR. Sin embargo, en algunas realizaciones, una o más FR pueden

contener uno o más residuos de aminoácido no humanos. En casos de alteraciones o modificaciones (por ejemplo, mediante introducción de un residuo no humano) en un entramado por lo demás humano, es posible que la FR alterada o modificada esté adyacente a una CDR modificada de otra especie o una secuencia de CDR al azar, mientras que en otras realizaciones, una FR alterada no está adyacente a una secuencia de CDR alterada de otra especie o una secuencia de CDR al azar. En algunas realizaciones, las secuencias de entramado de un anticuerpo humanizado son completamente humanas (es decir, no se realiza ningún cambio de entramado en el entramado humano). En realizaciones preferidas, las secuencias de entramado de un anticuerpo humanizado son completamente de línea germinal humana (es decir, no se realiza ningún cambio de entramado en el entramado de línea germinal humana).

Los residuos de aminoácido no humanos de otra especie, o una secuencia al azar, se denominan con frecuencia residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (por ejemplo, Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR de roedor (u otro mamífero) o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Además, también pueden generarse anticuerpos en los que sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana (por ejemplo, patente estadounidense 4.816.567). En la práctica, normalmente los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor o, tal como se indicó anteriormente, en los que se han sustituido secuencias de CDR por secuencias al azar. Únicamente a modo de ejemplo no limitativo, se describen métodos para conferir afinidad de unión a CDR donadora a un entramado de región variable aceptora de anticuerpo en el documento WO 01/27160 A1, y en las solicitudes de patente estadounidense con números de serie 09/434.870 y 09/982.464.

- La elección de dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, que van a usarse en la preparación de los anticuerpos humanizados es importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado método de “ajuste óptimo”, se examina la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor que va a
- 5 humanizarse con respecto a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocidas. Entonces se acepta la secuencia humana que es más próxima a la del roedor como entramado humano (FR) para el anticuerpo humanizado (por ejemplo, Sims *et al.*, J. Immunol., 151: 2296 (1993), y Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método usa un entramado particular derivado de
- 10 la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. Puede usarse el mismo entramado para varios anticuerpos humanizados diferentes (por ejemplo, Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol., 151: 2623 (1993)).
- 15 En otras realizaciones, no hay necesidad de “seleccionar previamente” un entramado de anticuerpo humano particular (es decir, no hay necesidad de seleccionar un entramado humano con la homología o identidad de secuencia más próxima a un anticuerpo candidato dado que va a humanizarse). En estas realizaciones, puede usarse un entramado humano común o universal para aceptar una o más
- 20 CDR no humanas. En la realización preferida, se usa un único entramado universal, completamente humano, como entramado para todos los anticuerpos que van a humanizarse, independientemente de su homología con la(s) secuencia(s) de entramado de los anticuerpos candidatos. Con respecto a esto, pueden generarse anticuerpos humanizados sin realizar ningún cambio en la región de entramado.
- 25 Este entramado universal, completamente humano, puede aceptar entonces una o más secuencias de CDR. En una realización, la una o más secuencias de CDR son secuencias de CDR de un anticuerpo de otra especie (por ejemplo, ratón o rata) que se han modificado en comparación con la CDR correspondiente en el anticuerpo intacto de la otra especie (es decir, hay una introducción simultánea de la
- 30 CDR y modificación de la CDR que está introduciéndose en el entramado humano universal). La modificación corresponde a uno o más cambios de aminoácidos (en la CDR modificada) en comparación con la CDR correspondiente en el anticuerpo intacto de la otra especie. En una realización, se incluyen todos los residuos de aminoácido en la CDR en una biblioteca, mientras que en otras realizaciones, no

se incluyen todos los residuos de aminoácido de CDR en una biblioteca. En otra realización, la una o más secuencias de CDR son secuencias al azar, que sustituyen a secuencias de CDR.

- 5 En realizaciones preferidas, se humanizan anticuerpos con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. En algunas realizaciones, la afinidad del anticuerpo humanizado por el antígeno es superior a la afinidad del anticuerpo intacto, no humanizado, correspondiente o fragmento o parte del mismo (por ejemplo, el anticuerpo de roedor candidato). Con respecto a esto,
- 10 en algunas realizaciones, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Hay modelos de inmunoglobulina tridimensionales comúnmente disponibles y resultan familiares para los expertos en la técnica. Hay programas
- 15 informáticos disponibles que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de
- 20 la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR del receptor y secuencias importadas de modo que se logra la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad aumentada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR están implicados directamente y muy sustancialmente en influir sobre la unión a antígeno.
- 25 no.

Puede emplearse una variedad de métodos específicos, bien conocidos por un experto en la técnica, para introducir CDR de anticuerpo (o secuencias al azar que sustituyen a CDR de anticuerpo) en entramados de anticuerpo (véanse, por

30 ejemplo, las solicitudes estadounidenses 09/434.879 y 09/982.464). En algunas realizaciones, pueden usarse oligonucleótidos solapantes para sintetizar un gen de anticuerpo, o parte del mismo (por ejemplo, un gen que codifica para un anticuerpo humanizado). En otras realizaciones, puede llevarse a cabo la mutagénesis de un molde de anticuerpo usando los métodos de Kunkel (citado a continua-

ción), por ejemplo para introducir una CDR modificada o una secuencia al azar para sustituir a una CDR. En algunas realizaciones, se humanizan por separado regiones variables de cadena ligera y pesada, y después se coexpresan como una región variable humanizada. En otras realizaciones, regiones variables

5 humanizadas constituyen la región variable de un anticuerpo intacto. En algunas realizaciones, la región Fc del anticuerpo intacto que comprende una región variable humanizada se ha modificado (por ejemplo, se ha realizado al menos una modificación de aminoácido en la región Fc). Por ejemplo, un anticuerpo que se ha humanizado con CDR aleatorizada y sin cambios de entramado puede com-

10 prender al menos una modificación de aminoácido en la región Fc.

En otras realizaciones, se emplean animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, tras inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo,

15 se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión (JH) de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la completa inhibición de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana en ratones mutantes de línea germinal de este tipo dará como resultado

20 la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno (véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993), y Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993)). También pueden derivarse anticuerpos humanos de bibliotecas de presentación en fago (por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991), y Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14: 309

25 (1996)).

La presente descripción proporciona métodos para generar anticuerpos humanizados (y fragmentos de anticuerpo) que comprenden al menos una sustitución de aminoácido enumerada en la tabla 1 en el presente documento, en la región Fc

30 (en comparación con un polipéptido original que comprende una región Fc sin la sustitución de aminoácido). A continuación se comentan métodos adicionales para generar tales anticuerpos humanizados. La presente descripción también proporciona composiciones que comprenden los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo generados mediante esos métodos. De manera importante, los métodos

de humanización comentados a continuación, y otros métodos de humanización (por ejemplo, comentados anteriormente), pueden combinarse con las regiones Fc variantes. Con respecto a esto, pueden construirse anticuerpos humanizados con regiones Fc alteradas, únicas.

5

En algunas realizaciones, se proporciona un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; b) sintetizar primeros oligonucleótidos que codifican para partes de las FR de la región VH aceptora, en el que las partes de las FR en comparación con la segunda secuencia de referencia no están modificadas; y una población de segundos oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una parte de una primera CDR que se ha modificado, seleccionándose la primera CDR del grupo que consiste en HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia y ii) una o más partes de FR no modificadas que pueden hibridarse con los primeros oligonucleótidos; c) mezclar los primeros oligonucleótidos con la población de segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, en el que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.

30 En otras realizaciones, se proporciona un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR

- y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar primeros oligonucleótidos que codifican para partes de las FR de la región VL aceptora, en el que las partes de las FR en comparación con la segunda secuencia de referencia no están modificadas; y una población de segundos oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una parte de una primera CDR que se ha modificado, seleccionándose la primera CDR del grupo que consiste en LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia y ii) una o más partes de FR no modificadas que pueden hibridarse con los primeros oligonucleótidos; c) mezclar los primeros oligonucleótidos con la población de segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, en el que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.
- 20 En algunas realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprende: A) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; B) sintetizar una población de primeros oligonucleótidos, codificando cada uno para al menos una parte de una primera CDR seleccionada del grupo que consiste en HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia; y segundos oligonucleótidos que codifican para i) partes de las FR de la región VH aceptora, en el que las partes de las FR en comparación con la secuencia de referencia no están modificadas y ii) una o más partes

de una CDR que pueden hibridarse con la población de primeros oligonucleótidos; C) mezclar la población de primeros oligonucleótidos con los segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y D) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, en el que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada no están modificados con respecto a la segunda secuencia de referencia.

En otras realizaciones, se proporciona un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprende:

A) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; B) sintetizar a) una población de primeros oligonucleótidos, codificando cada uno para al menos una parte de una primera CDR seleccionada del grupo que consiste en LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia; y b) segundos oligonucleótidos que codifican para i) partes de las FR de la región VL aceptora, en el que las partes de las FR en comparación con la secuencia de referencia no están modificadas y ii) una o más partes de una CDR que pueden hibridarse con la población de primeros oligonucleótidos; C) mezclar la población de primeros oligonucleótidos con los segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y D) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, en el que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.

En algunas realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de (e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican

para región VH alterada con un ácido nucleico que codifica para región variable de cadena ligera para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En algunas realizaciones, la síntesis comprende síntesis química. En algunas realizaciones, el aceptor es humano. En algunas realizaciones, el tratamiento de la etapa (d) comprende la extensión mediante una polimerasa.

En otras realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR, comprendiendo la segunda secuencia de referencia una región VH; b) sintetizar una población de secuencias génicas de anticuerpo de región VH alterada, en el que las FR de las regiones VH alteradas son idénticas a las FR de la segunda secuencia de referencia y al menos una primera CDR de las regiones variables de anticuerpo alteradas se ha modificado, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la CDR donadora correspondiente de la primera secuencia de referencia.

En algunas realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar una población de secuencias génicas de anticuerpo de región VL alterada, en el que las FR de las regiones VL alteradas son idénticas a las FR de la segunda secuencia de referencia y al menos una primera CDR de la región VL de anticuerpo alterada se ha modificado, en el que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la CDR donadora correspondiente de la primera secuencia de referencia.

- En algunas realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada con un ácido nucleico que codifica para región VH para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En algunas realizaciones, el aceptor es humano. En algunas realizaciones, la síntesis implica el uso de oligonucleótidos solapantes.
- 10 Aún en otras realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de una secuencia de aminoácidos de referencia, comprendiendo la secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; b) sintetizar una población de secuencias génicas de anticuerpo de región VH alterada, en el que las FR de las regiones VH alteradas son idénticas a las FR de la secuencia de referencia y al menos una primera CDR de las regiones variables de anticuerpo alteradas comprende una secuencia de aminoácidos al azar.
- 15
- 20 En otras realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de una secuencia de aminoácidos de referencia, comprendiendo la secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar una población de secuencias génicas de anticuerpo de región VL alterada, en el que las FR de las regiones VL alteradas son idénticas a las FR de la secuencia de referencia y al menos una primera CDR de las regiones VL de anticuerpo alteradas comprende una secuencia de aminoácidos al azar.
- 25
- 30 Aún en otras realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de una secuencia de aminoácidos de referencia, comprendiendo la secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora humana que comprende FR; b) sintetizar una población de secuencias

génicas de anticuerpo de región VH alterada, en el que las FR de las regiones VH alteradas son idénticas a las FR de la secuencia de referencia humana y al menos una primera CDR de las regiones variables de anticuerpo alteradas comprende una secuencia de aminoácidos al azar. En algunas realizaciones, la representación de la secuencia de referencia humana es en forma electrónica.

En otras realizaciones, se contempla un método de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprende: a) proporcionar una representación de una secuencia de aminoácidos de referencia, comprendiendo la secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora humana que comprende FR; b) sintetizar una población de secuencias génicas de anticuerpo de región VL alterada, en el que las FR de las regiones VL alteradas son idénticas a las FR de la secuencia de referencia humana y al menos una primera CDR de las regiones VL de anticuerpo alteradas comprende una secuencia de aminoácidos al azar.

En algunas realizaciones, la representación de la secuencia de referencia es en forma electrónica. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada con un ácido nucleico que codifica para región VH para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En algunas realizaciones, la síntesis implica el uso de oligonucleótidos solapantes. En algunas realizaciones, las CDR se definen mediante la definición de Kabat.

En algunas realizaciones, se modifican una o más FR simultáneamente con la introducción de una o más CDR modificadas. En otras realizaciones, los entramados modificados están adyacentes a las CDR modificadas.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por

las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; b) sintetizar a) una primera población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para una FR de región VH modificada, o parte de la misma, en los que la FR de región VH, o parte de la misma, contiene una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de región de entramado aceptora, en los que las posiciones de entramado que se cambian se seleccionan de entre las posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; y b) una segunda población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una CDR modificada, o parte de la misma, en los que la CDR modificada, o parte de la misma, comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente y ii) una o más partes de FR adyacentes que pueden hibridarse con la primera población de oligonucleótidos; y c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada. En determinadas realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En otras realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de (e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada con un ácido nucleico que codifica para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En realizaciones adicionales, la síntesis comprende síntesis química. En algunas realizaciones, el aceptor es humano. En realizaciones preferidas, la una o más de la población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas son parte de un anticuerpo que comprende una región Fc, en el que la región Fc comprende al menos una sustitución de aminoácido en comparación con un polipéptido original que tiene una región Fc.

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada,

que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar a) una primera población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para una FR de región VL modificada, o parte de la misma, en los que la región de entramado de región VL, o parte de la misma, contiene una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de región de entramado aceptora, en los que las posiciones de entramado que se cambian se seleccionan de entre las posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; y b) una segunda población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una CDR modificada, o parte de la misma, en los que la CDR modificada, o parte de la misma, comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente y ii) una o más partes de FR adyacentes que pueden hibridarse con la primera población de oligonucleótidos; y c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada. En otras realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En realizaciones adicionales, los métodos comprenden además la etapa de (e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada con un ácido nucleico que codifica para región variable de cadena pesada para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una

región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; b) sintetizar a) una primera población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para una
 5 región de entramado de región VH modificada, o parte de la misma, en los que la FR de región VH, o parte de la misma, contiene una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de FR aceptora en los que las posiciones de entramado que se cambian se
 10 seleccionan de entre las posiciones de entramadoceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; y b) una segunda población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una CDR modificada, o parte de la misma, en los que la
 15 CDR modificada, o parte de la misma, comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente y ii) una o más partes de FR adyacentes que pueden hibridarse con la primera población de oligonucleótidos; y c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda para crear oligonucleótidos
 20 solapantes; y d) extender los oligonucleótidos solapantes con una ADN polimerasa en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada.

Todavía en otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de
 25 construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por
 30 las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar a) una primera población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para una FR de región VL modificada, o parte de la misma, en los que la FR de región VL, o parte de la misma,

contiene una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de FR aceptora, en los que las posiciones de entramado que se cambian se seleccionan de entre las posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian

5 en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; y b) una segunda población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una CDR modificada, o parte de la misma, en los que la CDR modificada, o parte de la misma, comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la se-

10 cuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente y ii) una o más partes de FR adyacentes que pueden hibridarse con la primera población de oligonucleótidos; y c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda para crear oligonucleótidos solapantes; y d) extender los oligonucleótidos solapantes con una ADN polimerasa en condiciones tales que se construye

15 una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada.

En algunas realizaciones, se introducen una o más modificaciones en el entramado, simultáneamente con la introducción de una o más CDR modificadas. Las CDR modificadas pueden comprender una o más alteraciones de aminoácido en

20 comparación con la CDR de una secuencia de referencia. En determinadas realizaciones, los métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una

25 región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; b) sintetizar i) una primera población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para al menos una CDR modifi-

30 cada, en los que la CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente; y ii) una segunda población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para partes modificadas de un entramado de región VH, conteniendo la parte modificada una pluralidad de ami-

noácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de región de entramado aceptora, en los que las posiciones de entramado que se cambian se seleccionan de entre las posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda en condiciones tales que al menos una parte de los oligonucleótidos se hibridan para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada. En determinadas realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En realizaciones adicionales, los métodos comprenden además la etapa de (e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada con un ácido nucleico que codifica para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En otras realizaciones, el aceptor es humano.

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; b) sintetizar i) una primera población de oligonucleótidos, que codifican cada uno para al menos una CDR modificada, en los que la CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente; y ii) una segunda población de oligonucleótidos, que comprende oligonucleótidos que codifican para partes modificadas de un entramado de región VL, conteniendo la parte modificada una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de FR aceptora, en los que las posiciones de entramado que se cambian se seleccionan de entre

- las posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de entramado donadoras de la primera secuencia de referencia; c) mezclar las poblaciones de oligonucleótidos primera y segunda en condiciones tales que
- 5 al menos una parte de los oligonucleótidos se hibridan para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada.
- 10 En determinadas realizaciones, pueden generarse los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que comprenden una variante de Fc y una región variante de cadena pesada alterada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprenden: a) proporcionar una re-
- 15 presentación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora que
- 20 comprende FR; b) sintetizar A) primeros oligonucleótidos que codifican para partes de las FR de la región VH aceptora, en los que las partes de las FR en comparación con la segunda secuencia de referencia no están modificadas; y B) una población de segundos oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una parte de una primera CDR que se ha modificado, seleccionándose la primera
- 25 CDR del grupo que consiste en HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en los que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia y ii) una o más partes de FR no modificadas que pueden hibridarse con los primeros oligonucleótidos; c) mezclar los primeros oligonucleótidos con la
- 30 población de segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, en los que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada no están modificados con respecto a la segunda secuencia de referencia. En

algunas realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada con un ácido nucleico que codifica para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas.

5

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende FR b) sintetizar a) primeros oligonucleótidos que codifican para partes de las FR de la región VL aceptora, en los que las partes de las FR en comparación con la segunda secuencia de referencia no están modificadas; y b) una población de segundos oligonucleótidos, que codifican cada uno para i) al menos una parte de una primera CDR que se ha modificado, seleccionándose la primera CDR del grupo que consiste en LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en los que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia y ii) una o más partes de FR no modificadas que pueden hibridarse con los primeros oligonucleótidos; c) mezclar los primeros oligonucleótidos con la población de segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, en los que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprenden: A) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo la región va-

- riable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende FR; B) sintetizar a) una población de primeros oligonucleótidos, codificando cada uno para al menos una
- 5 parte de una primera CDR seleccionada del grupo que consiste en HCDR1, HCDR2 y HCDR3, en los que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia; y b) segundos oligonucleótidos que codifican para i) partes de las FR de la región VH aceptora, en los
- 10 que las partes de las FR en comparación con la secuencia de referencia no están modificadas y ii) una o más partes de una CDR que pueden hibridarse con la población de primeros oligonucleótidos; C) mezclar la población de primeros oligonucleótidos con los segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y D) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se
- 15 construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, en los que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.
- 20 En determinadas realizaciones, los métodos comprenden además la etapa de co-expresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada con un ácido nucleico que codifica para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas.
- 25 En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de construcción de una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, que comprenden: A) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de referencia la
- 30 secuencia de una región VL aceptora que comprende FR; B) sintetizar a) una población de primeros oligonucleótidos, codificando cada uno para al menos una parte de una primera CDR seleccionada del grupo que consiste en LCDR1,

LCDR2 y LCDR3, en los que la primera CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con las CDR donadoras correspondientes de la primera secuencia de referencia; y b) segundos oligonucleótidos que codifican para i) partes de las FR de la región VL aceptora, en los que
 5 las partes de las FR en comparación con la secuencia de referencia no están modificadas y ii) una o más partes de una CDR que pueden hibridarse con la población de primeros oligonucleótidos; C) mezclar la población de primeros oligonucleótidos con los segundos oligonucleótidos para crear oligonucleótidos solapantes; y D) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se cons-
 10 truye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada, en los que las FR codificadas por los ácidos nucleicos que codifican para región VL alterada no están modificadas con respecto a la segunda secuencia de referencia.

En otras realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de mejora de
 15 la afinidad de unión de una región variable de anticuerpo humanizado mutada, que comprenden: a) proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifica para una primera región variable de anticuerpo humanizado mutada, comprendiendo la región variable mutada (i) un entramado de anticuerpo humano de tipo natural, (ii) tres CDR de cadena pesada no humanas, y (iii) tres CDR de cadena
 20 ligera no humanas, en los que las CDR se definen mediante las definiciones combinadas de Kabat y Chothia, en los que al menos una de las CDR de cadena ligera es una CDR de cadena ligera que contiene mutación al menos con al menos un aminoácido diferente en al menos una posición en comparación con la CDR no humana de tipo natural correspondiente, y en los que la primera región variable de
 25 anticuerpo mutada tiene una afinidad de unión superior a la región variable de anticuerpo no mutada correspondiente; b) mutar la secuencia de ácido nucleico que codifica para la primera región variable de anticuerpo mutada en condiciones tales que se codifica una segunda región variable de anticuerpo humanizado mutada, comprendiendo la segunda región variable de anticuerpo humanizado mutada al
 30 menos un aminoácido diferente adicional en al menos una posición en la CDR de cadena ligera que contiene mutación, dando como resultado la mutación adicional en combinación con la primera mutación una afinidad de unión superior. En algunas realizaciones, la CDR de cadena ligera que contiene mutación de la primera región variable de anticuerpo humanizado mutada es CDR3 (LCDR3).

En otras realizaciones, al menos una de las CDR de cadena pesada no humanas de la primera región variable de anticuerpo humanizado mutada comprende una mutación, de tal manera que se codifica un aminoácido diferente en al menos una
 5 posición en comparación con la CDR no humana de tipo natural correspondiente. En realizaciones adicionales, la mutación de CDR de cadena pesada está en HCDR3.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona métodos de modificación simultánea de al menos una CDR y al menos una FR mientras se construye una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH alterada, que comprenden: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH donadora, comprendiendo
 10 la región variable donadora i) cuatro FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VH aceptora que comprende cuatro FR, tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; b) sintetizar i) para cada FR que va a modificarse, una población de
 15 oligonucleótidos, codificando cada uno para una FR modificada, o parte de la misma, conteniendo la FR modificada o parte de la misma una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la región de entramado correspondiente en la secuencia de referencia de región VH aceptora, en los que las posiciones de FR que están cambiadas se seleccionan de entre las
 20 posiciones de entramado aceptoras de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de región de entramado donadora de la primera secuencia de referencia; y ii) para cada CDR que va a modificarse, una población de oligonucleótidos, codificando cada uno para una CDR modificada, o parte de la misma, en los que la CDR modificada comprende un aminoácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente; y iii) para cada una de cualquier FR restante y no modificada, oligonucleótidos que codifican para la FR, o parte de la misma, que tienen la misma secuencia que la FR correspondiente de la segunda secuencia aceptora de referen-
 25
 30

cia; y iv) para cada una de cualquier CDR restante y no modificada, oligonucleótidos que codifican para la CDR, o parte de la misma, que tienen la misma secuencia que la CDR correspondiente de la primera secuencia donadora de referencia, en los que oligonucleótidos individuales de (i) a (iv) que codifican para partes ad-
 5 yacentes de la región VH tienen secuencias solapantes en sus extremos terminales; y c) mezclar los oligonucleótidos y las poblaciones de oligonucleótidos sintetizados en la etapa b) en condiciones tales que las secuencias solapantes de oligonucleótidos individuales se hibridan para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se forma una po-
 10 blación de nucleótidos que codifican para región VH alterada. En determinadas realizaciones, la representación de secuencias de referencia primera y segunda es en forma electrónica. En realizaciones adicionales, la región de entramado que va a modificarse se selecciona del grupo que consiste en HFR1, HFR2 y HFR3. En otras realizaciones, la CDR que va a modificarse es HCDR3. En otras realiza-
 15 ciones, el método comprende además la etapa de e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VH con un ácido nucleico que codifica para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas. En diferente realizaciones, el método comprende además la etapa de e) coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región
 20 VH con una población de ácidos nucleicos que codifican para región VL para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas.

En otras realizaciones, se emplean los métodos de modificación simultánea de al menos una CDR y al menos una FR mientras se construye una población de áci-
 25 dos nucleicos que codifican para región VL alterada, comprendiendo dicho método: a) proporcionar una representación de secuencias de aminoácidos de referencia primera y segunda, comprendiendo la primera secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL donadora, comprendiendo la región variable donadora i) cuatro FR y ii) tres CDR tal como se define por las definiciones
 30 combinadas de Kabat y Chothia; comprendiendo la segunda secuencia de aminoácidos de referencia la secuencia de una región VL aceptora que comprende cuatro FR, tal como se define por las definiciones combinadas de Kabat y Chothia; b) sintetizar i) para cada FR que va a modificarse, una población de oligonucleótidos, codificando cada uno para una FR modificada, o parte de la misma,

conteniendo la FR modificada, o parte de la misma, una pluralidad de aminoácidos cambiados en una o más posiciones en comparación con la región de entramado correspondiente en la secuencia de referencia de región VL aceptora, en el que las posiciones de FR que están cambiadas se seleccionan de entre las posi-

5 ciones de FR aceptora de la segunda secuencia de referencia que se diferencian en la posición correspondiente en comparación con las posiciones de FR donadoras de la primera secuencia de referencia; y ii) para cada CDR que va a modificarse, una población de oligonucleótidos, codificando cada uno para una CDR modificada, o parte de la misma, en el que la CDR modificada comprende un ami-

10 noácido diferente en una o más posiciones en comparación con la secuencia de referencia de aminoácidos de CDR donadora correspondiente; y iii) para cada una de cualquier región FR restante y no modificada, oligonucleótidos que codifican para la FR, o parte de la misma, que tiene la misma secuencia que la FR correspondiente de la segunda secuencia aceptora de referencia; y iv) para cada una de

15 cualquier CDR restante y no modificadas, oligonucleótidos que codifican para la CDR, o parte de la misma, que tiene la misma secuencia que la CDR correspondiente de la primera secuencia donadora de referencia, en el que, oligonucleótidos individuales de (i) a (iv) que codifican para partes adyacentes de la región VL tienen secuencias solapantes en sus extremos terminales, y c) mezclar los oligo-

20 nucleótidos y las poblaciones de oligonucleótidos sintetizados en la etapa b) en condiciones tales que las secuencias solapantes de oligonucleótidos individuales se hibridan para crear oligonucleótidos solapantes; y d) tratar los oligonucleótidos solapantes en condiciones tales que se forma una población de nucleótidos que codifican para región alterada. En determinadas realizaciones, los métodos com-

25 prenden además la etapa de coexpresar la población de ácidos nucleicos que codifican para región VL con una población de ácidos nucleicos que codifican para región VH para producir una población diversa de regiones variables heteroméricas alteradas.

30 (v) Anticuerpos multiespecíficos

La presente descripción proporciona anticuerpos multiespecíficos que comprenden una región Fc variante. Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Aunque normalmente tales

moléculas sólo se unirán a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos se abarcan por esta expresión cuando se usa en el presente documento. Los ejemplos de BsAb incluyen, pero no se limitan a, aquellos con un brazo dirigido

5 do contra un antígeno de célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula desencadenante citotóxica tal como anti-Fc γ RI/anti-CD 15, anti-pl 85HER2/Fc γ RIII (CD 16), anti-CD3/anti-célula B maligna (D1D0), anti-CD3/anti-pl 85HER2, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anti-carcinoma de células renales, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D I (anti-carcinoma de colon), anti-CD3/anti-

10 análogo de hormona estimulante de melanocitos, anti-receptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMAI, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, anti-molécula de adhesión a células neuronales (NCAM)/anti-CD3, anti-proteína de unión a folato (FBP)/anti-CD3, anti-antígeno asociado con carcinoma de páncreas (AMOC-31)/anti-CD3; BsAb con un brazo que se une específicamente a un antígeno tu-

15 moral y un brazo que se une a una toxina tal como anti-saporina/anti-id-1, anti-CD22/anti-saporina, anti-CD7/anti-saporina, anti-CD38/anti-saporina, anti-CEA/anti-cadena A de ricina, anti-interferón α (IFN- α)/anti-idiotipo de hibridoma, anti-CEA/anti-alcaloide de la vinca; BsAb para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/anti-fosfatasa alcalina (que cataliza la conver-

20 sión de profármaco fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAb que pueden usarse como agentes fibrinolíticos tales como anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno tisular (tPA), anti-fibrina/anti-activador de plasminógeno de tipo urocinasa (uPA); BsAb para dirigir complejos inmunitarios a receptores de superficie celular tales como anti-lipoproteína de baja densidad (LDL)/anti-FcR (por

25 ejemplo, Fc γ RI, Fc γ RII o Fc γ RIII); BsAb para su uso en la terapia de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/anti-virus del herpes simple (VHS), anti-complejo receptor de células T:CD3/anti-influenza, anti-Fc γ R/anti-VIH; BsAb para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-pl85HER2/anti-hapteno; BsAb como adyuvantes de vacuna;

30 y BsAb como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, anti-peroxidasa del rábano (HRP)/anti-hormona, anti-somatostatina/anti-sustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-p-galactosidasa.

Los ejemplos de anticuerpos triespecíficos incluyen, pero no se limitan a, anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (por ejemplo, Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido al ordenamiento al azar de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadros) producen una posible mezcla de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta puede realizarse mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

En otro enfoque, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Se insertan ADN que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión separados, y se transfectan conjuntamente en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones distintas de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no tienen significación particular. En una realización preferida de este enfoque, los anticuer-

pos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo (véase, por ejemplo, el documento WO 94/04690). Según otro enfoque descrito en el documento W096/27011 la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recubren a partir de un cultivo de células recombinantes. Los anticuerpos específicos también incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina.

B. Moléculas de inmuno adhesina

La presente descripción también proporciona moléculas de inmuno adhesina que comprenden una región Fc variante. Un tipo de diseño de inmuno adhesina combina el/los dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, una región Fc variante). De manera habitual, cuando se preparan las inmuno adhesinas, se fusionará ácido nucleico que codifica para el dominio de unión de la adhesina en el extremo C-terminal con ácido nucleico que codifica para el extremo N-terminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo también son posibles fusiones N-terminales.

Normalmente, en tales fusiones el polipéptido quimérico codificado conservará al menos dominios bisagra, CH2 y CH3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se realizan fusiones con el extremo C-terminal de la parte Fc de un dominio constante, o inmediatamente N-terminal a la CH1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios particulares y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción o características de unión de la inmuno adhesina.

En algunas realizaciones, se fusiona la secuencia de adhesina con el extremo N-terminal de la región Fc variante de inmunoglobulina G1. Es posible fusionar la

región constante de cadena pesada completa con la secuencia de adhesina. Sin embargo, en realizaciones preferidas, se usa en la fusión una secuencia que comienza en la región bisagra justo en sentido de 5' del sitio de escisión de papaína que define Fc de IgG químicamente (es decir, residuo 216, considerando que el primer residuo de la región constante de cadena pesada es 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En determinadas realizaciones preferidas, se fusiona la secuencia de aminoácidos de adhesina con (a) la región bisagra y CH2 y CH3 o (b) los dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3, de una cadena pesada de IgG. En algunas realizaciones, las inmuno adhesinas son biespecíficas. Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En tales realizaciones, las secuencias de adhesina pueden fusionarse con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, o bien entre el dominio bisagra y el CH2 o bien entre los dominios CH2 y CH3 (véase, por ejemplo, Hoogenboom *et al.*, Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991)).

Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en las inmuno adhesinas de la presente invención, puede estar presente una cadena ligera de inmunoglobulina o bien asociada covalentemente con un polipéptido de fusión de adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina o bien fusionada directamente con la adhesina. En el primer caso, normalmente se expresa conjuntamente ADN que codifica para una cadena ligera de inmunoglobulina con el ADN que codifica para la proteína de fusión de adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada y la cadena ligera híbridas estarán covalentemente asociadas para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidos mediante enlace disulfuro. Se dan a conocer métodos adecuados para la preparación de tales estructuras, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 4.816.567.

En realizaciones preferidas, se construyen inmuno adhesinas fusionando la secuencia de ADNc que codifica para la parte de adhesina en marco con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede usarse la fu-

sión con fragmentos de inmunoglobulina genómicos. Generalmente, este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Pueden aislarse ADN que codifican para regiones constantes de cadena pesada de IgG basándose en secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos de sangre periférica o bazo, mediante hibridación o mediante técnicas de PCR. Los ADNc que codifican para las partes de “adhesina” y de inmunoglobulina de la inmunoadhesina pueden insertarse en tándem en un vector de plásmido que dirige la expresión eficaz en las células huésped elegidas.

10 Semivida alterada de polipéptidos variantes

El receptor de Fc neonatal “FcRn” es un homólogo de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) que no sólo suministra IgG a través de la barrera materno-fetal durante la gestación, sino que también está implicado en la regulación de la semivida sérica de IgG. Para una revisión reciente sobre FcRn véase Ghetie, V y E.S. Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000. FcRn se une a IgG de una manera dependiente del pH produciéndose la unión a pH ligeramente ácidos y produciéndose poca unión o unión no detectable a pH 7,4. Se plantea que las IgG se captan por células que expresan FcRn y entran en endosomas ácidos en los que se produce la interacción FcRn-IgG. Entonces se transportan las IgG a la superficie celular y se liberan a pH casi neutro. Las IgG que no se unen a FcRn tras la captación en células entran en compartimentos lisosómicos y se degradan. Concuerda con este modelo la hipótesis de que polipéptidos que comprenden una región Fc variante que se une a FcRn con afinidad aumentada tienen una semivida sérica más larga que aquéllos con una afinidad menor.

25 El papel de FcRn como transportador de IgG indica que regiones Fc variantes con afinidad alterada por FcRn pueden tener utilidad terapéutica o bien en el contexto de un anticuerpo monoclonal o bien cuando se unen operativamente a una proteína heteróloga, es decir, distinta de anticuerpo. Los polipéptidos terapéuticos que se beneficiarán por aclararse rápidamente del sujeto o del paciente o por no transportarse a través de la membrana placentaria, por ejemplo, polipéptidos radiomarcados, se beneficiarán por unirse operativamente a una región Fc que presenta una afinidad de unión a FcRn disminuida. Alternativamente, polipéptidos que se beneficiarán de tener una semivida sérica más larga y por tanto necesitan

administrarse pocas veces o por transportarse a través de la membrana placentaria preferiblemente se unirán operativamente a una región Fc que presenta afinidad de unión a FcRn potenciada (véanse las tablas 2, 5 y 6). Se contemplan numerosas combinaciones de características de Fc, por ejemplo, puede generarse

5 una región Fc con afinidad de unión a FcRn potenciada pero con poca o ninguna actividad de CDC o ADCC incorporando una o más sustituciones de aminoácidos de Fc que potencian la afinidad de unión a FcRn tal como se indica en la tabla 2 en, por ejemplo, una región Fc original de IgG4, o en una región Fc original de IgG1 en combinación con sustitución de aminoácido que disminuye la actividad de

10 CDC y ADCC.

Polipéptidos preferidos que se beneficiarán de una semivida sérica aumentada por estar operativamente unidos a una región Fc variante de la invención que presenta una afinidad de unión a FcRn potenciada en comparación con el polipéptido

15 original son polipéptidos terapéuticos de mamífero incluyendo moléculas tales como, por ejemplo, renina; una hormona de crecimiento; hormona de crecimiento humana; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de hormona de crecimiento; grelina; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteína; cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; α 1-antitripsina; PAI-1;

20 proinsulina; trombopoyetina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagones; factores de coagulación tales como factor VIIIc, factor IX, factor tisular y factor de von Willebrand; factores anticoagulantes tales como proteína C; factor natriético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador de plasminógeno, tal como urocinasa o activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) o

25 de orina humana; bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; interleucinas, por ejemplo, IL-1 a IL-10, IL-20; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; una albúmina sérica tal como albúmina sérica humana; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, tal como

30 beta-lactamasa; ADNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5 ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como NGF-beta, cardiotrofinas (factor

- de hipertrofia cardíaco) tal como cardiotrofina 1 (CT-1); factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGR); factor de crecimiento de fibroblastos tal como aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF) o su receptor; factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, EGF- β 2, EGF- β 3, EGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión a factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD-3, CD-4, CD-8 y CD-19; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea, un factor de diferenciación del crecimiento (por ejemplo, GDF-8); un interferón tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF; GM-CSF y G-CSF; un anticuerpo anti-HER-2 sin una región Fc nativa de una IgG; un anticuerpo anti-VSR sin una región Fc nativa de una IgG; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígeno viral tal como, por ejemplo, una parte de la envuelta de VIH-1; proteína de transporte; receptores de direccionamiento; adresinas; proteínas reguladoras; anticuerpos sin una región Fc nativa de una IgG; y fragmentos o precursores de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.
- La región Fc variante que comprende una sustitución de aminoácido que confiere una semivida sérica alterada al polipéptido (es decir, afinidad de unión a FcRn potenciada) al que está operativamente unida está de manera preferible operativamente unida al extremo carboxilo o amino-terminal del polipéptido de interés generando de ese modo una proteína de fusión.

25

Secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones Fc variantes

- La presente descripción también proporciona secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones Fc variantes, así como composiciones, vectores y células huésped que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican para regiones Fc variantes. La presente descripción también proporciona métodos recombinantes para producir una región Fc variante.

30

Generalmente, para la producción recombinante de variantes, se aísla ácido nucleico que codifica para la variante y se inserta en un vector. Pueden transfectarse

células huésped con el vector, permitiendo de ese modo amplificar la secuencia de ácido nucleico y/o producir el péptido variante. Pueden aislarse y secuenciarse secuencias de ácido nucleico que codifican para las variantes peptídicas de la presente invención usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando
5 sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a ácido nucleico que codifica para la variante). Generalmente, la secuencia de ácido nucleico que codifica para la variante está operativamente unida a otros elementos, tales como una secuencia señal (por ejemplo, secuencias señal secretoras), un origen de replicación, al menos un gen marcador, un potenciador, un promotor o un termina-
10 dor de la transcripción. En determinadas realizaciones, se transfectan de manera estable células huésped con ácido nucleico que codifica para una variante para generar una línea celular que expresa una variante particular. En realizaciones preferidas, las variantes se expresan en células CHO, NSO, Sp2/0, PER.C6 o HEK293. En la técnica se conocen bien métodos recombinantes.

15

Pueden mutarse secuencias de ácido nucleico de tal manera que pueden producirse regiones Fc variantes. Por ejemplo, puede mutarse una secuencia de ácido nucleico que codifica para una región Fc original (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-12) de tal manera que se obtiene como resultado al menos un cambio de aminoácido
20 cuando se expresa la secuencia de ácido nucleico. Además, pueden mutarse secuencias de ácido nucleico que codifican para al menos una parte de una región Fc original para producir secuencias de aminoácidos que comprenden al menos una parte de una región Fc variante.

25 En determinadas realizaciones, se emplea síntesis basada en codones para generar secuencias mutadas. Los ejemplos de síntesis basada en codones incluyen, por ejemplo, las descritas en las patentes estadounidenses 5.264.563, 5.523.388 y 5.808.022. En resumen, puede realizarse síntesis basada en codones acoplando secuencialmente monómeros sobre soportes separados para formar al menos
30 dos tipletes diferentes. El acoplamiento puede realizarse en recipientes de reacción separados, después mezclando los soportes de los recipientes de reacción y dividiendo los soportes mezclados en dos o más recipientes de reacción separados, y repitiendo las etapas de acoplamiento, mezclado y división una o más ve-

ces en los recipientes de reacción, terminando con una etapa de mezclado o división. Adicionalmente, pueden escindirse los oligonucleótidos de los soportes.

Formulaciones y usos terapéuticos

- 5 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona formulaciones terapéuticas que comprenden las variantes descritas en el presente documento. Por ejemplo, tales composiciones pueden incluir un polipéptido variante (o parte del mismo), proporcionado junto con líquidos, geles, portadores sólidos, diluyentes, adyuvantes y excipientes fisiológicamente tolerables, y combinaciones de los
- 10 mismos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)).

Además, pueden usarse variantes polipeptídicas junto con, antes o después de otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin limitarse a, salicilatos, esteroides,

15 inmunosupresores, anticuerpos o antibióticos. Los agentes terapéuticos particulares que pueden usarse con las variantes de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los siguientes agentes, compuestos de azobenceno (patente estadounidense n.º 4.312.806), derivados de rodamina sustituidos con bencilo (patente estadounidense n.º 5.216.002), sales de zinc de L-carnosina (patente estadounidense n.º 5.238.931), 3-fenil-5-carboxipirazoles e isotiazoles (patente estadounidense n.º 5.294.630), IL-10 (patente estadounidense n.º 5.368.854), inhibidores de la síntesis de leucotrieno de quinolina (patente estadounidense n.º 5.391.555), 2'-halo-2'-desoxiadenosina (patente estadounidense n.º 5.506.213), compuestos de fenol y benzamida (patente estadounidense n.º 5.552.439), tributirina (patente estadounidense n.º 5.569.680), determinados péptidos (patente estadounidense n.º 5.756.449), ácidos omega-3 poliinsaturados (patente estadounidense n.º 5.792.795), bloqueantes de VLA-4 (patente estadounidense n.º 5.932.214), metasulfobenzoato de prednisolona (patente estadounidense n.º 5.834.021), agentes limitadores de citocinas (patente estadounidense n.º 5.888.969) y nicotina (patente estadounidense n.º 5.889.028).

25

30

Pueden usarse polipéptidos variantes junto con agentes que reducen la viabilidad o el potencial proliferativo de una célula. Los agentes que reducen la viabilidad o el potencial proliferativo de una célula pueden funcionar de una variedad de ma-

neras incluyendo, por ejemplo, inhibir la síntesis de ADN, inhibir la división celular, inducir la apoptosis, o inducir la muerte celular no apoptótica. Los ejemplos específicos de agentes citotóxicos y citostáticos incluyen, pero no se limitan a, proteína antiviral de fitolaca, abrina, ricina y cada una de sus cadenas A, doxorubicina, cisplatino, yodo 131, itrio 90, renio 188, bismuto 212, taxol, 5-fluorouracilo, VP-16, bleomicina, metotrexato, vindesina, adriamicina, vincristina, vinblastina, BCNU, mitomicina y ciclofosfamida y determinadas citocinas tales como TNF- α y TNF- β . Por tanto, los agentes citotóxicos y citostáticos pueden incluir, por ejemplo, radio-núclidos, fármacos quimioterápicos, proteínas y lectinas.

10

Las composiciones terapéuticas pueden comprender, por ejemplo, aditivos normalmente empleados tales como aglutinantes, cargas, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, tampones y excipientes tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones contienen normalmente el 1%-95% de principio activo, preferiblemente el 2%-70% de principio activo.

15

Los polipéptidos variantes también pueden mezclarse con diluyentes o excipientes que son compatibles y fisiológicamente tolerables. Son diluyentes y excipientes adecuados, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, las composiciones pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes estabilizantes o de tamponamiento del pH.

25

En algunas realizaciones, las composiciones terapéuticas se preparan o bien como suspensiones o disoluciones líquidas, como pulverizaciones o bien en formas sólidas. Las formulaciones orales incluyen habitualmente aditivos normalmente empleados tales como aglutinantes, cargas, portadores, conservantes, agentes estabilizantes, emulsionantes, tampones y excipientes tales como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, y similares. Estas composiciones adoptan la forma de disoluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida o polvos, y contienen normalmente el 1%-

30

95% de principio activo, preferiblemente el 2%-70%. Se describe un ejemplo de una composición oral útil para administrar las composiciones terapéuticas de la presente invención en la patente estadounidense n.º 5.643.602.

- 5 Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración, tales como administración tópica, incluyen ungüentos, tinturas, cremas, lociones, parches transdérmicos y supositorios. Para los ungüentos y las cremas, los aglutinantes, portadores y excipientes tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos. Se describe un ejemplo de un método de
- 10 administración tópica en la patente estadounidense n.º 5.834.016. También pueden emplearse otros métodos de administración liposómicos (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.851.548 y 5.711.964).

Las formulaciones también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que esté tratándose, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente unos a otros. Tales moléculas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.

- 20 También pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el polipéptido variante, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen, pero
- 25 no se limitan a, poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico
- 30 y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Los polipéptidos variantes pueden usarse para tratar a un sujeto. Tal tratamiento puede administrarse a un sujeto con una enfermedad, o puede administrarse de manera profiláctica a un sujeto (por ejemplo, a un sujeto predispuesto a padecer una enfermedad). Los ejemplo de estados que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, cáncer (por ejemplo, en el que el polipéptido variante se une al receptor HER2, CD20 o factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)); estados alérgicos tales como asma (con un anticuerpo anti-IgE); y trastornos mediados por LFA-1 (por ejemplo, en los que el polipéptido variante es un anticuerpo anti-LFA-I o anti-ICAM-I), etc.

10

En realizaciones preferidas, las variantes polipeptídicas usadas para tratar a sujetos comprenden anticuerpos o inmunoadhesinas. También en realizaciones preferidas, las enfermedades tratadas son enfermedades sensibles a anticuerpos o inmunoadhesinas. Los ejemplos de enfermedades sensibles a anticuerpos incluyen enfermedades y estados médicos tales como: linfoma (que se muestra que puede tratarse con RITUXAN, un anticuerpo anti-CD20), enfermedad infecciosa (que se muestra que puede tratarse con SYNAGIS, un anticuerpo dirigido a la proteína F del virus sincitial respiratorio), trasplante de riñón (ZENAPAX, un anticuerpo anti-receptor de IL-2, ha mostrado ser útil), enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (que se muestra que puede tratarse con REMICADE, un anticuerpo anti-TNF α), carcinoma de mama (que se muestra que puede tratarse con HERCEPTIN, un anticuerpo anti-20 HER2) y cáncer de colon (que se muestra que puede tratarse con EDRECOLOMAB, un anticuerpo anti-17-1A). Los polipéptidos variantes usados para tratar cáncer comprenderán preferiblemente una sustitución de aminoácido en la región Fc de la invención que confiere actividad de ADCC potenciada y/o actividad de CDC potenciada al polipéptido.

En algunas realizaciones, se emplea un polipéptido variante con actividad de ADCC mejorada en el tratamiento de enfermedades o trastornos en el que se desea la destrucción o eliminación de tejido o microorganismos foráneos. Por ejemplo, puede usarse la variante para tratar cáncer; trastornos inflamatorios; infecciones (por ejemplo, infecciones bacterianas, virales, fúngicas o por levaduras); y otros estados (tales como bocio) en los que se desea la eliminación de tejido. En otras realizaciones, el polipéptido variante tiene actividad de ADCC disminu-

da. Tales variantes pueden usarse para tratar enfermedades o trastornos en los que se desea un polipéptido que contiene región Fc con una semivida larga, pero preferiblemente el polipéptido no tiene función/funciones efectora(s) no deseada(s). Por ejemplo, el polipéptido que contiene región Fc puede ser un anticuerpo anti-factor tisular (TF); anticuerpo anti-IgE; y anticuerpo anti-integrina (por ejemplo, un anticuerpo anti- α 437). El mecanismo de acción deseado de tales polipéptidos que contienen región Fc puede ser bloquear pares de unión ligando-receptor. Además, el polipéptido que contiene región Fc con actividad de ADCC disminuida puede ser un anticuerpo agonista.

10

Los polipéptidos variantes usados para tratar cáncer comprenderán preferiblemente una sustitución de aminoácido en la región Fc de la invención (véase, por ejemplo, la tabla 2 en el presente documento) que confiere actividad de ADCC potenciada y/o actividad de CDC potenciada al polipéptido.

15

Los polipéptidos variantes pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado, incluyendo administración parenteral, subcutánea, tópica, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal e intralesional (por ejemplo, para el tratamiento inmunosupresor local). Las infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, la variante polipeptídica se administra de manera adecuada mediante infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del polipéptido variante. Preferiblemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferiblemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación apropiada de variante polipeptídica dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, la gravedad y el transcurso de la enfermedad, si el polipéptido variante se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta a la variante polipeptídica, y el criterio del médico encargado. El polipéptido variante se administra de manera adecuada al paciente en una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 0,1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,120 mg/kg) de polipéptido variante es una dosificación candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión
5 continua. Una dosificación diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo del estado, el tratamiento se mantiene hasta que los síntomas se reducen suficientemente o se eliminan. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente
10 mediante técnicas y ensayos convencionales, y puede usarse para ajustar la dosificación para alcanzar un efecto terapéutico.

Estas cantidades sugeridas de polipéptido variante están sujetas a una gran cantidad de criterio terapéutico. El factor clave en la selección de una dosis y calendario apropiados es el resultado obtenido. Los factores para su consideración en
15 este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del anticuerpo, el tipo particular de anticuerpo, el método de administración, el calendario de administración y otros factores conocidos por los profesionales médicos.
20

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido variante que va a administrarse es el nivel de dosificación requerido para un paciente de tal manera que se reducen los síntomas de la enfermedad que está tratándose. Adicionalmente,
25 una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico suficiente para retrasar o minimizar o prevenir la aparición de la enfermedad, por ejemplo, retrasar o minimizar o prevenir la diseminación del cáncer. Una cantidad terapéuticamente eficaz puede referirse a la cantidad de agente terapéutico (por ejemplo, polipéptido variante), también puede referirse a la cantidad
30 del agente terapéutico que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfermedad en un sujeto. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz con respecto a un agente terapéutico de la invención se refiere a la cantidad de agente terapéutico solo, o en combinación con otras terapias, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o la gestión de una enfer-

medad en un sujeto. No se necesita formular el polipéptido variante, pero opcionalmente se hace, con uno o más agentes usados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad eficaz de tales otros agentes depende de la cantidad de polipéptido variante presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y otros factores comentados anteriormente. Un primer agente profiláctico o terapéutico (por ejemplo, polipéptido variante o polipéptido que comprende una región Fc variante de la invención o fragmento funcional de la misma) puede administrarse antes de, concomitantemente con o después de la administración de un segundo agente profiláctico o terapéutico a un sujeto con un trastorno.

Los agentes terapéuticos pueden congelarse o liofilizarse para su almacenamiento y reconstituirse en un portador estéril adecuado antes de su uso. La liofilización y reconstitución pueden conducir a diversos grados de pérdida de actividad de anticuerpo. Pueden tener que ajustarse las dosificaciones para compensar. Generalmente, se prefiere un pH de entre 6 y 8.

En el presente documento se contempla el uso de un anticuerpo monoclonal que comprende una región Fc variante de la presente invención para tratar o prevenir al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente (por ejemplo, cáncer) en los que antígeno al que se une el anticuerpo monoclonal es perjudicial o que se beneficia de niveles disminuidos del antígeno. Adicionalmente, se contempla el uso de un anticuerpo que comprende una región Fc variante de la presente invención para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de al menos uno de los trastornos mencionados anteriormente.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en cuanto a prevenir parcial o completamente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", tal como se usa en el presente documento, incluye la administración de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de una enfermedad o un estado en un mamífero, particularmente en un ser humano, e in-

cluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero al que aún no se le ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o del trastorno o aliviar síntomas o complicaciones del mismo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o puede reducirse o aumentarse proporcionalmente la dosis tal como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

Anticuerpos anti-CD20

Se da a conocer un anticuerpo anti-CD20 que comprende una región Fc variante (véanse, por ejemplo, el ejemplo 4 y la figura 4 en el presente documento). Un anticuerpo anti-CD20 comprende una región Fc variante, o parte de la misma que comprende la sustitución de aminoácido, enumerada en las tablas 1-10 en el presente documento, el anticuerpo anti-CD20 puede comprender además un péptido con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 13, 14, 15 ó 16. En otra realización, un anticuerpo anti-CD20 comprende una región Fc variante o parte de la misma que comprende la sustitución de aminoácido, enumerada en las tablas 1-10 en el presente documento, y que comprende además péptidos con las secuencias mostradas en:

- a) SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14;
- b) SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16;
- c) SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 y 22; o
- d) SEQ ID NO: 23, 24, 25, 26, 27 y 28.

El anticuerpo anti-CD20 de la invención comprende una región Fc variante, que comprende sustitución/sustituciones de aminoácido(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en:

a) 247I y 339D; y

b) 247I y 339Q;

5

y comprende además una región variable que comprende polipéptidos con las SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14.

Usos de región Fc variante adicionales

- 10 Las variantes, y secuencias de ácido nucleico que codifican para variantes, de la presente descripción pueden usarse de muchas maneras. Por ejemplo, pueden usarse variantes en ensayos de selección de fármacos. Por ejemplo, pueden evaluarse compuestos candidatos para determinar su capacidad para alterar o interferir con funciones efectoras de Fc poniendo en contacto una variante con el
- 15 compuesto candidato y determinando la unión del compuesto candidato a la variante. Puede inmovilizarse la variante usando métodos conocidos en la técnica tales como unión de una proteína de fusión GST-variante a una perla polimérica que contiene glutatión. Se construye un gen quimérico que codifica para una proteína de fusión de GST fusionando ADN que codifica para la variante de interés al
- 20 ADN que codifica para el extremo carboxilo terminal de GST (véase, por ejemplo, Smith *et al.*, Gene 67:31 [1988]). Entonces se transforma el constructo de fusión en un sistema de expresión adecuado (por ejemplo, *E. coli* XA90) en el que puede inducirse la expresión de la proteína de fusión de GST con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). La inducción con IPTG debe proporcionar la proteína
- 25 de fusión como constituyente principal de proteínas celulares solubles. Las proteínas de fusión pueden purificarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo la purificación mediante cromatografía de afinidad con glutatión. La unión del compuesto candidato a la variante está correlacionada con la capacidad del compuesto para alterar la una o más funciones efectoras.

30

En otro método de selección, se inmoviliza o bien la variante o bien un FcR seleccionado usando métodos conocidos en la técnica, tal como adsorción sobre una placa de microtitulación de plástico o unión específica de una proteína de fusión de GST a una perla polimérica que contiene glutatión. Por ejemplo, se une GST-

variante a perlas de glutatión-Sepharose. Entonces se pone en contacto la variante inmovilizada con un FcR y un compuesto candidato. Entonces se retira el péptido no unido y se solubiliza el complejo y se analiza para determinar la cantidad de péptido marcado unido. Una disminución en la unión es una indicación de que el compuesto candidato inhibe la interacción de la variante con el FcR. Este método de selección es particularmente útil con variantes de la presente invención que muestra un nivel aumentado de Una variación de este método permite la selección de compuestos que pueden alterar un complejo variante/receptor de Fc anteriormente formado. Por ejemplo, en algunas realizaciones se inmoviliza un complejo que comprende una variante unida a un FcR tal como se describió anteriormente y se pone en contacto con un compuesto candidato. La disolución del complejo por el compuesto candidato se correlaciona con la capacidad del compuesto para alterar o inhibir la interacción entre la variante que está sometiéndose a prueba y el FcR que está. Con respecto a esto, pueden identificarse compuestos con el potencial terapéutico (por ejemplo, en seres humanos) (por ejemplo, compuestos útiles para tratar una enfermedad humana, tal como enfermedades autoinmunitarias).

Otra técnica para la selección de fármacos proporciona una selección de alto rendimiento para compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a péptidos variantes y se describe en detalle en el documento WO 84/03564. En resumen, se sintetizan grandes números de compuestos de prueba peptídicos pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como pasadores de plástico o alguna otra superficie. Entonces se hacen reaccionar los compuestos de prueba peptídicos con péptidos variantes y se lavan. Entonces se detectan los péptidos variantes unidos mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Otra técnica usa anticuerpos dirigidos a péptidos variantes. Tales anticuerpos que pueden unirse específicamente a péptidos variantes compiten con un compuesto de prueba por la unión a una variante dada. De esta manera, los anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos del péptido variante.

La presente descripción contempla muchos otros medios de selección de compuestos. Los ejemplos proporcionados anteriormente se presentan simplemente para ilustrar una gama de técnicas disponibles. Un experto habitual en la técnica apreciará que pueden usarse muchos otros métodos de selección.

5

En particular, la presente descripción contempla el uso de líneas celulares transfectadas con ácido nucleico que codifica para al menos una región Fc variante para seleccionar compuestos por su actividad, y en particular para la selección de alto rendimiento de compuestos a partir de bibliotecas combinatorias (por ejemplo, 10 bibliotecas que contienen más de 10^4 compuestos). Las líneas celulares de la presente invención pueden usarse en una variedad de métodos de selección.

Las variantes pueden usarse como agente de purificación por afinidad. Por ejemplo, la variante puede inmovilizarse sobre una fase sólida tal como una resina 15 Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. Entonces se pone en contacto la variante inmovilizada con una muestra que contiene el antígeno que va a purificarse, y posteriormente se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material la muestra excepto el antígeno que va a purificarse, que está unido a la variante polipeptídica inmovili- 20 zada. Finalmente, se lava el soporte con otro disolvente adecuado, tal como tampón de glicina, pH 5,0, que liberará el antígeno del polipéptido variante.

El polipéptido variante también puede ser útil en ensayos de diagnóstico (por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células específicas, tejidos o suero). Para aplicaciones de diagnóstico, la variante se marcará 25 normalmente con un resto detectable (tales marcadores también son útiles en los ensayos de la región Fc descritos anteriormente). Hay numerosos marcadores disponibles, incluyendo, pero sin limitarse a, radioisótopos (por ejemplo, ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I), marcadores fluorescentes (por ejemplo, quelatos de tierras raras 30 (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, Lissamine, ficoeritrina y Texas Red), y diversos marcadores de enzima-sustrato (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.275.149), y luciferasa, luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa del rábano (HRPO), fosfatasa alcalina, 3-galactosidasa,

glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa y similares). Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo: (i) peroxidasa del rábano (HRPO) con hidrógeno peroxidasa como sustrato, en las que la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor colorante (por ejemplo, ortofenilen-diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina (TMB)); (ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y (iii) D-galactosidasa (R-D-Gai) con un sustrato cromogénico o sustrato fluorogénico.

10

Las variantes también pueden usarse para ensayos de diagnóstico *in vivo*. Por ejemplo, se marca el polipéptido variante con un radionúclido de modo que el antígeno o las células que lo expresan pueden localizarse usando inmunoescintigrafía.

15

Tabla 1 Variantes de Fc

<u>Posición⁺</u>	<u>Sustitución de aminoácido[*]</u>
235	G, R
236	F, R, Y
237	K, N, R
238	E, G, H, I, L, V, W, Y
244	L
245	R
247	A, D, E, F, M, N, Q, R, S, T, W, Y
248	F, P, Q, W
249	L, M, N, P, Y
251	H, I, W
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, V, W, Y
255	K, N
256	H, I, K, L, V, W, Y
257	A, I, M, N, S
258	D
260	S
262	L
264	S
265	K, S
267	H, I, K

268	K
269	N, Q
271	T
272	H, K, L, R
279	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
280	T
283	F, G, H, I, K, L, M, P, R, T, W, Y
286	F
288	N, P
292	E, F, G, I, L
293	S, V
301	W
304	E
307	E, M
312	P
315	F, K, L, P, R
316	F, K
317	P, T
318	N, P, T
332	F, G, L, M, S, V, W
339	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, W, Y
341	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
343	A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
373	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W
375	R
376	E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
377	G, K, P
378	D, N
379	N, Q, S, T
380	D, N, S, T
382	D, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
385	E, P
386	K
423	N
424	H, M, V
426	D, L
427	N
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
431	H, K, P
432	R, S
438	G, K, L, T, W
439	E, H, Q
440	D, E, F, G, H, I, K, L, M, Q, T, V
442	K

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

^{*} Por ejemplo, en la posición 249: 249L, 249M, 249N o 249Y

Tabla 2 Variantes de Fc: cambios de la función efectora

Varian- te [*]	ADCC poten-	ADCC disminui-	Unión a FcRn po-	Unión a FcRn	CDC po- tenciada	CDC disminui-
----------------------------	----------------	-------------------	---------------------	-----------------	---------------------	------------------

	ciada	da	tenciada	disminui- da		da
235G						X
235Q		X		X		
235R		X				
235S		X				X
236F		X				
236R		X				X
236Y		X		X	X	
237E		X				X
237K		X		X		X
237N		X				X
237R		X		X		X
238A		X				X
238E		X		X		X
238G		X		X		X
238H		X		X		X
238I		X				X
238L		X	X			X
238V		X				X
238W		X		X		X
238Y		X		X		X
244L			X		X	
245R		X	X			X
247A	X			X	X	
247D				X	X	
247E				X	X	
247F	X			X		
247G		X		X	X	
247H	X			X		X
247I	X			X		X
247L	X			X		X
247M	X			X		
247N				X	X	
247Q				X	X	
247R		X		X	X	
247S				X	X	
247T	X					X
247V	X					
247W				X	X	
247Y	X			X		X
248A				X		
248F				X	X	
248P				X	X	
248Q				X	X	
248W				X	X	

249E	X			X	X	
249L		X		X	X	
249M				X	X	
249N					X	
249P		X	X		X	
249Y	X			X	X	
250K		X			X	
250M		X	X			X
250R		X		X	X	
251F	X			X	X	
251H		X		X	X	
251I		X		X	X	
251W		X		X	X	
252Y		X	X			X
254A				X	X	
254D				X		X
254E				X		X
254F	X			X	X	
254G				X		
254H				X		
254I				X		X
254K				X	X	
254L		X		X	X	
254M	X			X	X	
254N				X		
254P		X		X		X
254Q		X		X		X
254R				X	X	
254T		X		X		X
254V		X		X		X
254W				X	X	
254Y	X			X	X	
255K				X	X	
255N				X		X
256A	X		X		X	
256F	X			X		
256G			X		X	
256H				X		
256I				X	X	
256K				X		
256L					X	
256M	X			X	X	
256P			X		X	
256Q				X	X	
256R				X		
256V		X				

256W				X	X	
256Y				X	X	
257A		X	X			X
257I		X	X			X
257M		X	X			X
257N		X	X			X
257S		X	X			X
257V		X	X			X
258D	X		X			
260S		X	X		X	
262L		X	X			X
264S		X		X		X
265H		X				X
265K		X				
265S		X		X		
265Y		X		X		X
267G		X		X		X
267H		X				X
267I		X		X		X
267K		X				X
268D	X			X	X	
268E	X		X			
268K				X		X
269N		X				X
269Q		X				X
270A		X		X		X
270G		X				X
270K		X	X			X
270M		X		X		X
270N		X				X
271T		X				X
272H		X	X			X
272K		X	X			
272L		X	X			X
272N		X				X
272R		X	X			
279A	X		X			
279D		X	X			
279F		X				
279G			X			
279H			X			
279I				X		
279K		X		X		
279L		X		X		
279M			X			
279N			X			

279Q			X		X	
279R			X			
279S			X		X	
279T			X			
279W		X	X		X	
279Y			X		X	
280A	X			X		
280K	X				X	
280T				X	X	
283A	X		X			
283D		X	X			
283F		X	X		X	
283G		X	X		X	
283H		X	X		X	
283I	X		X		X	
283K	X		X		X	
283L		X	X		X	
283M	X				X	
283N			X		X	
283P			X		X	
283Q			X			
283R	X		X		X	
283S			X		X	
283T			X			
283W		X	X		X	
283Y		X	X			
285N		X	X			
286F			X			
288N	X		X			
288P		X	X			
292A	X					X
292E		X		X		
292F		X		X		
292G		X		X		
292I		X		X		
292L				X	X	
293S		X				X
293V		X	X			
301W		X				X
304E		X				
307A		X	X		X	
307E		X	X			X
307M		X	X		X	
311A	X		X			
311D	X			X		
311E				X		X

311F		X		X	X	
311G				X		
311I		X	X		X	
311K		X	X		X	
311L			X		X	
311M			X		X	
311R				X	X	
311N	X			X		
311S		X				X
311T	X				X	
311V	X		X		X	
311W			X		X	
311Y	X			X	X	
312P		X	X		X	
314F		X		X	X	
314I		X			X	
314V		X		X	X	
314W		X		X	X	
314Y					X	
315F		X		X	X	
315K				X	X	
315L	X				X	
315P		X		X	X	
315R					X	
316F		X		X		X
316K			X		X	
317P		X	X		X	
317T				X	X	
318N	X		X		X	
318P	X					X
318T	X		X		X	
318V	X					
326W		X		X	X	
327T		X		X		X
328V		X				X
329Y		X				X
330K	X					X
330R						X
332A					X	
332D	X				X	
332E	X				X	
332F			X		X	
332G					X	
332H		X	X		X	
332K		X	X			X
332L		X	X		X	

332M			X		X	
332N					X	
332Q					X	
332R		X	X			
332S			X		X	
332T	X				X	
332V	X				X	
332W		X	X		X	
332Y					X	
339D	X				X	
339E				X		X
339F	X				X	
339G	X			X	X	
339H					X	
339I	X				X	
339K	X				X	
339L				X		
339M	X					X
339N	X		X		X	
339Q	X				X	
339R	X			X	X	
339S	X				X	
339T	X		X		X	
339W			X		X	
339Y					X	
341D		X		X	X	
341E		X		X	X	
341F		X		X	X	
341H		X			X	
341I		X		X	X	
341K		X		X	X	
341L		X		X	X	
341M		X		X	X	
341N		X		X	X	
341P		X	X		X	
341Q		X		X	X	
341R		X		X	X	
341S		X		X	X	
341T		X		X	X	
341V				X	X	
341W		X		X	X	
341Y		X		X	X	
343A		X			X	
343D		X			X	
343E		X	X		X	
343F		X				

343G		X			X	
343H		X	X		X	
343I						X
343K			X		X	
343L		X			X	
343M		X		X	X	
343N		X			X	
343Q		X	X		X	
343R		X	X		X	
343S		X			X	
343T		X	X		X	
343V		X		X		
343W		X		X	X	
343Y		X	X		X	
373A		X		X		
373D		X		X	X	
373E		X			X	
373F		X			X	
373G		X		X		
373H					X	
373I		X			X	
373K		X		X	X	
373L		X		X	X	
373M		X		X	X	
373N		X		X	X	
373Q		X		X	X	
373R		X			X	
373S		X		X		X
373T		X		X	X	
373V		X		X	X	
373W		X		X	X	
375R		X	X		X	
376A	X		X		X	
376E		X				
376F		X			X	
376G		X	X		X	
376H		X		X	X	
376I			X			
376L				X	X	
376M			X			
376N					X	
376P			X		X	
376Q					X	
376R					X	
376S					X	
376T			X		X	

376V	X		X		X	
376W		X		X		
376Y		X		X		
377G	X					
377K	X		X			
377P					X	
378D			X			X
378N			X			
379N	X				X	
379Q		X			X	
379S					X	
379T					X	
380A			X		X	
380D						X
380N	X		X		X	
380S	X		X		X	
380T			X		X	
382A	X					
382D		X				X
382F	X		X			X
382H			X			
382I	X		X		X	
382K			X			
382L			X		X	
382M			X			
382N			X			X
382P						X
382Q			X		X	
382R			X			X
382S		X	X			X
382T			X			
382V			X		X	
382W			X			X
382Y			X			X
385E	X					X
385P						X
386K					X	
423N			X			X
424H						X
424M		X		X		X
424V				X		
426D				X	X	
426L					X	
427N	X		X			X
429A		X		X	X	
429F		X		X	X	

429M	X			X	X	
430A			X		X	
430D				X	X	
430F			X		X	
430G			X		X	
430H		X	X		X	
430I			X		X	
430K		X	X		X	
430L			X		X	
430M			X		X	
430N		X	X		X	
430P					X	
430Q		X	X			
430R		X	X		X	
430S			X		X	
430T			X		X	
430V			X		X	
430W		X		X	X	
430Y			X		X	
431H			X		X	
431K			X			
431P				X	X	
432R		X		X	X	
432S		X		X	X	
434G			X			X
434H			X			X
434I		X		X		X
434W	X		X		X	
434Y			X		X	
436I	X		X			X
436L			X			
436T			X			X
438G						X
438K			X			
438L			X		X	
438T			X			X
438W			X		X	
439E						X
439H						X
439Q				X		X
440A				X		X
440D		X		X		
440E				X		
440F				X		X
440G	X					X
440H	X		X			

[illegible]

Tabla 3 ADCC potenciada

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido [*]
247	A, F, H, I, L, M, T, V, Y
249	E, Y
251	F
254	F, M, Y
256	A, M
258	D
268	D, E
279	A
280	A, K
283	A, I, K, M, R
288	N
292	A
311	A, D, N, T, V, Y
315	L
318	N, P, T, V
330	K
332	T, V
339	D, F, G, I, K, M, N, Q, R, S, T
376	A, V
377	G, K
379	N
380	N, S
382	A, I
385	E
427	N
429	M
434	W
436	I
440	G, H, I, L

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

* Por ejemplo, en la posición 249: 249E o 249Y

Tabla 4 ADCC disminuida

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido
235	Q, R, S
236	F, R, Y
237	E, K, N, R
238	E, G, H, I, L, V, W, Y
247	G, R
249	L, P
250	K, M, R
251	H, I, W
252	Y
254	L, P, Q, T, V
256	V
257	A, I, M, N, S, V
260	S
262	L
264	S
265	H, K, S
267	G, H, I, K
269	N, Q
270	A, G, K, M, N
271	T
272	H, K, L, N, R
279	D, F, K, L, W
283	D, F, G, H, L, T, W, Y
285	N
288	P
292	E, F, G, I
293	S, V
301	W
304	E
307	A, E, M
311	F, I, K, S
312	P
314	F, I, V, W
315	F, P
316	F
317	P
327	T
328	V
329	Y
332	G, K, L, R, W
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, Y
343	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
373	A, D, E, F, G, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W

375	R
376	A, E, F, G, H, W, Y
379	Q
382	D, S
429	A, F
430	H, K, N, Q, R, W
432	R, S
434	I
440	D, T, V
442	K

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

Tabla 5 Afinidad de unión a FcRn potenciada

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido
238	L
244	L
245	R
249	P
252	Y
256	P
257	A, I, M, N, S, V
258	D
260	S
262	L
270	K
272	L, R
279	A, D, G, H, M, N, Q, R, S, T, W, Y
283	A, D, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, W, Y
285	N
286	F
288	N, P
293	V
307	A, E, M
311	A, I, K, L, M, V, W
312	P
316	K
317	P
318	N, T
332	F, H, K, L, M, R, S, W
339	N, T, W
341	P
343	E, H, K, Q, R, T, Y
375	R
376	G, I, M, P, T, V
377	K
378	D, N
380	N, S, T
382	F, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y

423	N
427	N
430	A, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y
431	H, K
434	F, G, H, W, Y
436	I, L, T
438	K, L, T, W
440	K
442	K

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

Tabla 6 Afinidad de unión a FcRn disminuida

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido
235	Q
236	Y
237	K, R
238	E, G, H, W
247	A, D, E, F, G, H, I, L, M, N, Q, R, S, W, Y
248	A, F, P, Q, W
249	E, L, M, Y
251	F, H, I, W
254	D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, Y
255	K, N
256	F, H, I, K, M, R, W, Y
264	S
265	S, Y
267	G, I
268	D, K
270	A, M
279	I, K, L
280	T
292	E, F, G, I, L
311	D, E, F, G, N, R, Y
315	F, K, P
316	F
317	T
326	W
327	T
339	E, G, L, R
341	D, E, F, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, Y
343	M, V, W
373	A, D, G, K, L, M, N, Q, S, T, V, W
376	H, L, W, Y
424	M, V
426	D
429	A, F, M
430	D, W
431	P
432	R, S
434	I
439	Q
440	A, D, E, F, M

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

Tabla 7 CDC potenciada

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido
236	Y
244	L
247	A, D, E, G, N, Q, R, S, W
248	F, P, Q, W
249	E, L, M, N, P, Y
250	K, R
251	F, H, I, W
254	A, F, K, L, M, R, Y
255	K
256	A, G, I, L, M, P, Q, W, Y
260	S
268	D
279	Q, S, W, Y
280	K, T
283	F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, W
292	L
307	A, M
311	F, I, K, L, M, T, V, W, Y
312	P
314	F, I, V, W, Y
315	F, K, L, P, R
316	K
317	P, T
318	N, T
332	A, D, E, F, G, H, L, M, N, Q, S, T, V, W, Y
339	D, F, G, H, I, K, N, Q, R, S, T, W, Y
341	D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y
343	A, D, E, G, H, K, L, M, N, Q, R, S, T, W, Y
373	D, E, F, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W
375	R
376	A, F, G, H, L, N, P, Q, R, S, T, V
377	P
379	N, Q, S, T
380	A, N, S, T
382	I, L, Q, V
386	K
426	D, L
429	A, F, M
430	A, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, Y
431	H, P
432	R, S
434	W, Y
438	L, W
440	Q, Y

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

Tabla 8 CDC disminuida

Posición ⁺	Sustitución de aminoácido
235	G, S
236	R
237	E, K, N, R
238	A, E, G, H, I, L, V, W, Y
245	R
247	H, I, L, T, Y
250	M
252	Y
254	D, E, I, P, Q, T, V
255	N
257	A, I, M, N, S, V
262	L
264	S
265	H, Y
267	G, H, I, K
268	K
269	N, Q
270	G, M, N
271	T
272	H, L, N
292	A
293	S
301	W
307	E
311	E, S
316	F
318	P
327	T
328	V
329	Y
330	K, R
332	E, M
343	I
373	S
378	D
380	D
382	D, F, N, P, R, S, W, Y
385	E, P
423	N
424	H, M
427	N

⁺ Posición de aminoácido de Fc según la numeración de EU

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de demostrar e ilustrar adicio-

nalmente determinadas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la misma.

EJEMPLO I – Selección de regiones Fc variantes en ensayos de ADCC

- 5 Este ejemplo describe cómo se seleccionan regiones Fc variantes, en el contexto de un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo anti-CD20) en un ensayo de ADCC.

i. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

- Se obtienen aproximadamente 50 ml de sangre periférica a partir de un donante sano y se diluyen 1:2 con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,0. Se mezclan las disoluciones agitando suavemente el tubo. Se recubren de manera cuidadosa aproximadamente 12 ml de Histopaque-1077 (n.º de cat. de Sigma 1077-1) bajo la muestra de sangre diluida seguido por centrifugación en una centrífuga Sorvall RT6000B con rotor flotante a 1000 rpm durante 10 min. con freno desactivado. Se descarta la fase superior del gradiente mediante aspiración y se recoge la interfase que contiene CMSP, de color blanco, y se lava 3 veces con solución salina equilibrada de Hank (n.º de cat. de Gibco 14025-092). Se suspende el sedimento celular lavado en aproximadamente 20 ml de medios RPMI 1640 que contienen suero bovino fetal al 10% (FBS) (n.º de cat. de Omega Scientific FB-01). Se dividen las CMSP resuspendidas en dos matraces de cultivo T-175 y se añaden 30 ml de RPMI que contiene FBS al 10% a cada uno, seguido por incubación durante la noche en un incubador a 37°C, CO₂ al 5%. Al día siguiente se recogen las CMSP no adherentes en tubos Falcon de 50 ml, se centrifugan como anteriormente y se resuspenden en RPMI que contiene FBS al 1% que carece de rojo de fenol. Se diluye 10 veces una pequeña parte de las células resuspendidas y se cuentan usando un hemocitómetro. Se colocan las CMSP restantes en el incubador hasta que se necesitan.

- ##### ii. Línea celular diana (específica para ensayos de ADCC con anticuerpo anti-CD20)

Pueden obtenerse líneas de células B que expresan CD20 Wil.2 y SKW6.4 de ATCC y hacerse crecer según se recomienda. Un día antes de usarse, se dividen 2 veces las células. Al día siguiente se ajusta el número de células hasta 4×10^5

células/ml y se añaden alícuotas de 50 μ l (20.000 células/pocillo) a una placa de cultivo tisular de 96 pocillos.

iii. Diluciones de IgG

5

Antes de la selección, se expresa IgG que comprende una variante de Fc de la presente invención, se purifica y se cuantifica usando un ELISA convencional. Para la selección de ADCC de un único punto primaria, se diluyen variantes de IgG hasta 40 ng/ml en medios RPMI que contienen FBS al 1% que carece de rojo de fenol. Se diluye 4 veces la concentración de IgG final en el ensayo (es decir, concentración final de 10 ng/ml). Se añaden alícuotas de cincuenta microlitros de IgG a las células diana y se incuban durante aproximadamente 15 minutos a 37°C antes de añadir las células efectoras a las células diana opsonizadas.

15 Cuando se realizan titulaciones de IgG, se varía la concentración de IgG en el intervalo de desde aproximadamente 0,0001 hasta 1 μ g/ml. Se preparan diluciones de IgG usando una placa de microtitulación de 96 pocillos diluyendo las muestras en RPMI que contiene FBS al 1% que carece de rojo de fenol. Entonces se añaden las muestras de IgG diluidas a la placa de ensayo que contiene las células di-
20 ana.

iv. Células efectoras

Se ajusta la concentración de CMSP de modo que la razón de efector con respecto a diana está en el intervalo de 10-20:1 (es decir, $2-4 \times 10^6$ células/ml). Se añaden cien microlitros de las CMSP resuspendidas a cada pocillo de las células diana opsonizadas. Se incuban las placas a 37°C en presencia de CO₂ al 5% durante 3-4 horas.

v. Detección de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

30 Se mide la lisis de células diana detectando la liberación de enzima LDH a partir del citoplasma de células dañadas en el sobrenadante de cultivo. Tras la incubación de las células diana opsonizadas con las células efectoras, se centrifugan las placas de ensayo a 2000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, se retiran

aproximadamente 75 µl del sobrenadante de cultivo celular mientras que se evitan los residuos y las células sedimentadas. Se añade este sobrenadante directamente a una placa de microtitulación y a esto se le añaden 75 µl de reactivo de detección de LDH (n.º de cat. de Roche 1 644 793). Entonces se incuba la placa durante aproximadamente 15-30 min. y se lee la absorbancia a 490 nm usando un lector de microplacas Vmax Kinetic de Molecular Devices.

vi. Análisis de datos

Todos los ensayos de selección de ADCC se realizan por duplicado. Cada placa de ensayo contiene controles para determinar la lisis de diana espontánea, lisis de efector más diana espontánea en ausencia de IgG y lisis total de células diana. La lisis total de células diana se alcanza mediante la adición de Triton X-100 al 1% a las células diana. Se incluyen controles de tipo natural en cada placa de ensayo y se calcula el promedio de la señal de ensayo de ADCC. Se resta el valor de fondo, obtenido a partir de los controles de lisis espontánea, de cada muestra. Se resta el valor de fondo, obtenido a partir de la IgG diluida, de cada muestra. Se convierten los datos de valores de absorbancia en porcentajes de lisis específica basándose en los controles de lisis espontánea y total. Se calcula el porcentaje de lisis específica a partir de la siguiente ecuación: porcentaje de lisis específica = $(A_{490} \text{ experimental} - A_{490} \text{ de fondo}) / (A_{490} \text{ máxima} - A_{490} \text{ de fondo}) \times 100$, en la que la A₄₉₀ de fondo es la suma de la A₄₉₀ obtenida a partir de las células efectoras y diana en ausencia de IgG y el fondo de IgG debido a LDH contaminante presente en los sobrenadantes de IgG en bruto. Se normaliza el porcentaje de la actividad de variante de Fc con respecto al promedio de los controles de tipo natural. Se calcula el promedio del porcentaje de la actividad normalizada para placas de ensayo por duplicado y se calcula la desviación estándar entre placas de ensayo individuales para cada muestra.

vii. Resultados

En las tablas 9 (sustituciones individuales) y 10 (sustituciones combinatorias) a continuación se muestra la actividad específica de ADCC relativa. Los valores de CDC notificados en la tabla 9 se generan tal como se describe en el ejemplo 2 en el presente documento y el valor del ensayo de unión a FcRn notificado en la tabla 9 se genera tal como se describe en el ejemplo 3 en el presente documento.

En las tablas 1 y 2 anteriores se resumen adicionalmente los resultados. Las sustituciones combinatorias que producen un valor de ADCC superior a cualquier sustitución individual sola son: 247F,339D; 247I,339D; 247L,339D; 247L,339T; y 247I,339Q. Las sustituciones combinatorias que producen una ADCC inferior al 80% de la ADCC de tipo natural aunque tenían una ADCC superior a la del tipo natural cuando se sometieron a prueba solas son: 247A,339D; 247Y,339H; 247I,339I; 247T,339I; 247L,339N; 247A,339Q; y 247A,339R. Las sustituciones combinatorias que producen una ADCC inferior al 10% de la ADCC de tipo natural aunque tenían una ADCC superior a la del tipo natural cuando se sometieron a prueba solas son: 247I,339I; 247T,339I; y 247L,339N.

Tabla 9

WT*	Posición y variantes*	ADCC	% de CV	FcRn, pH 6,0	% de CV	DCD	% de CV	n =
	WT (a,z)	100		100		100		
L	235A	87	23.2	102	11.9	67	7.9	2
L	235E	80	17.4	87	16.2	48	35.8	2
L	235G	93	30.3	85	21.2	58	46.0	2
L	235Q	86	1.8	81	14.4	98	25.1	2
L	235R	45	10.5	93	34.1	110	13.8	2
L	235S	92	2.0	85	40.0	0	262.9	2
G	236F	0	942.1	88	7.9	0	283.3	2
G	236R	0	228.7	101	20.6	14	110.1	4
G	236Y	8	72.7	76	10.0	168	0.3	2
G	237E	0	89.2	93	35.0	36	28.8	4

...

G	237K	0	113.3	78	12.8	12	136.0	4
G	237N	0	107.5	91	16.3	22	31.5	4
G	237R	0	81.3	56	60.6	28	10.5	4
P	238A	0	205.8	90	9.6	29	49.5	4
P	238E	0	20.6	76	6.7	24	101.0	4
P	238G	0	92.8	66	6.9	23	120.5	4
P	238H	0	48.9	72	11.4	11	206.3	4
P	238I	0	180.4	94	6.4	18	54.1	4
P	238L	0	37.4	115	13.6	34	50.1	4
P	238V	46	11.8	102	8.3	67	19.2	4
P	238W	0	66.6	87	5.4	23	103.4	4
P	238Y	0	34.0	74	15.8	16	288.8	4
P	244L	77	23.4	124	9.6	134	6.0	2
P	245R	62	15.0	188	7.2	42	5.3	2
P	247A	122	16.2	97	0.3	116	0.9	2
P	247D	95	23.4	54	2.8	131	1.1	2
P	247E	95	10.3	52	8.7	118	0.0	2
P	247F	144	18.8	6	1258.9	71	34.1	6
P	247G	82	16.1	75	4.2	137	0.9	2
P	247H	145	11.2	35	252.4	79	7.5	6
P	247I	140	22.9	79	30.7	22	198.3	6
P	247L	144	10.1	57	33.7	0	722.7	16
P	247M	127	21.0	18	1599.0	114	7.2	6
P	247N	91	37.2	41	38.7	109	4.0	2
P	247Q	103	8.5	26	294.3	137	3.7	4
P	247R	58	15.5	72	1.2	127	4.9	2
P	247S	106	38.6	81	15.0	130	2.6	2
P	247T	129	11.2	75	27.5	37	34.8	10
P	247V	120	13.5	Na	na	na	na	2
P	247W	102	6.5	0	1314.2	122	0.5	2
P	247Y	143	8.4	7	na	88	7.1	6
K	248A	100	5.4	15	179.9	102	2.4	2
K	248F	107	18.0	0	559.4	202	4.0	2
K	248P	103	9.1	34	99.4	226	1.3	2
K	248Q	101	0.5	38	89.3	174	17.9	2
K	248W	102	9.4	30	54.5	166	8.3	2
D	249E	110	6.7	78	22.4	258	16.1	4
D	249L	73	1.4	15	179.9	214	3.2	2
D	249M	101	9.6	50	4.5	163	1.2	2
D	249N	94	15.9	112	14.0	255	10.9	4
D	249P	56	4.0	138	21.0	119	0.2	2
D	249Y	110	8.8	41	28.3	170	6.6	2
T	250K	38	27.1	96	30.1	199	13.5	6
T	250M	78	11.0	165	7.4	47	6.6	4
T	250R	84	0.7	62	34.0	288	13.9	4
L	251F	125	6.0	64	47.6	160	16.6	10

L	251H	59	11.6	46	5.6	167	22.7	2
L	251I	84	9.8	7	333.3	190	18.8	2
L	251W	95	2.9	0	na	161	17.3	2
M	252Y	61	5.8	964	27.9	62	46.1	4
I	253A	103	6.1	0	12.0	81	23.9	4
S	254A	99	20.1	7	733.0	139	11.2	4
S	254D	101	14.2	7	113.9	74	31.2	2
S	254E	102	3.8	6	107.9	72	35.2	2
S	254F	121	11.2	0	1087.4	206	14.4	6
S	254G	100	14.7	7	86.8	102	6.1	2
S	254H	108	20.0	0	74.3	85	22.0	4
S	254I	99	2.5	25	64.3	80	11.5	4
S	254K	109	14.8	9	77.2	137	6.1	2
S	254L	89	9.8	74	12.6	227	12.1	6
S	254M	89	11.9	0	212.1	248	13.4	6
S	254N	90	13.3	8	5.6	76	34.6	2
S	254P	78	17.7	3	141.4	75	25.2	2
S	254Q	84	12.6	9	121.2	74	25.2	2
S	254R	99	1.3	14	128.2	152	4.8	2
S	254T	54	51.9	32	34.7	75	12.1	2
S	254V	68	40.5	31	40.5	84	4.4	2
S	254W	98	6.0	0	116.1	188	7.7	6
S	254Y	117	9.4	0	129.1	211	15.7	6
R	255K	96	3.5	41	65.9	276	9.3	4
R	255N	84	17.7	27	162.7	81	18.1	2
T	256A	115	16.5	160	3.0	190	19.6	2
T	256D	97	5.3	544	10.6	86	23.2	6
T	256E	91	12.9	339	8.4	104	7.2	6
T	256F	119	3.3	5	435.0	128	26.6	2
T	256G	95	20.0	162	8.0	221	24.5	2
T	256H	103	6.3	26	6.1	91	11.9	2
T	256I	93	11.5	72	3.7	157	16.2	4
T	256K	100	6.7	31	20.6	92	20.2	2
T	256L	93	3.9	78	60.5	267	22.7	4
T	256M	122	17.4	35	78.9	200	14.8	10
T	256N	102	7.2	229	6.4	86	23.2	2
T	256P	109	11.8	190	6.1	260	11.8	8
T	256Q	100	17.2	64	14.2	152	11.3	4
T	256R	94	8.8	33	60.0	71	47.1	2
T	256S	103	5.3	169	3.1	101	15.9	2
T	256V	82	11.1	114	30.5	109	11.0	2
T	256W	96	8.5	14	84.5	170	14.4	4
T	256Y	97	7.2	68	18.6	127	18.0	2
P	257A	86	11.5	319	15.0	34	53.7	4
P	257I	54	16.4	1022	14.5	46	22.4	6
P	257M	26	11.0	835	19.1	48	48.4	4

P	257N	27	13.1	867	15.7	62	31.4	4
P	257S	28	28.8	184	6.8	46	30.1	4
P	257V	18	97.9	447	41.5	27	143.5	2
E	258D	115	7.0	361	20.5	110	9.6	4
T	260S	93	5.6	124	7.4	171	17.1	2
V	262L	61	2.9	525	15.1	30	48.0	2
V	264S	10	39.8	78	20.0	50	36.7	2
D	265H	8	118.9	79	36.1	81	0.5	2
D	265K	10	146.2	107	34.3	84	46.4	2
D	265S	9	106.3	66	28.9	103	13.3	2
D	265Y	3	7.6	33	88.8	62	21.5	2
S	267G	29	8.6	86	0.9	60	18.1	4
S	267H	0	48.4	86	16.8	47	41.1	4
S	267I	0	78.0	83	11.8	50	37.8	4
S	267K	0	73.3	102	14.2	26	47.1	4
H	268D	110	7.8	68	32.4	122	10.7	6
H	268E	110	8.3	126	17.8	100	8.4	8
H	268K	98	17.6	86	10.4	24	112.7	4
E	269N	23	74.0	92	17.0	30	69.4	4
E	269Q	47	3.6	98	3.5	22	82.8	4
D	270A	41	35.5	87	6.0	36	66.5	4
D	270G	0	102.2	108	16.5	37	21.8	4
D	270K	15	465.5	122	8.4	0	462.9	4
D	270M	49	19.2	81	5.2	25	606.9	4
D	270N	28	1185.2	94	8.2	34	103.7	4
P	271T	26	53.9	96	20.4	32	89.1	4
E	272H	73	13.6	157	23.0	53	34.8	2
E	272K	70	8.9	320	20.4	118	28.7	4
E	272L	78	21.1	129	3.9	71	3.1	2
E	272N	90	7.5	110	33.0	71	34.6	2
E	272R	50	2.1	351	3.3	102	1.2	2
V	279A	114	14.6	214	5.0	106	21.2	2
V	279D	87	12.1	367	0.3	98	8.5	2
V	279F	81	4.8	113	14.3	106	10.0	2
V	279G	98	2.4	256	11.6	109	18.0	2
V	279H	79	28.1	173	29.6	127	22.7	6
V	279I	101	1.6	83	1.3	100	21.0	2
V	279K	91	1.5	79	26.1	106	0.7	2
V	279L	96	3.0	78	13.9	100	5.7	2
V	279M	107	8.3	122	3.5	91	10.3	2
V	279N	102	32.0	204	19.5	85	50.2	6
V	279Q	85	28.3	181	8.0	139	8.1	6
V	279R	105	4.8	130	10.7	98	8.7	2
V	279S	94	29.8	242	18.3	122	16.7	6
V	279T	95	15.5	265	6.9	110	12.8	10
V	279W	68	24.8	162	22.8	125	10.5	6

V	279Y	82	26.8	139	8.6	144	13.2	6
D	280A	111	44.9	55	50.1	135	28.7	2
D	280K	137	47.6	120	27.2	192	33.5	2
D	280T	108	na	60	12.6	122	8.7	4
E	283A	107	2.1	126	0.2	96	17.9	2
E	283D	84	8.4	110	4.0	92	10.3	2
E	283F	74	0.1	168	38.6	127	20.4	2
E	283G	93	3.1	137	4.4	135	8.5	2
E	283H	87	6.1	206	6.5	123	15.9	2
E	283I	106	1.9	143	5.6	126	12.3	2
E	283K	109	5.8	246	5.1	133	8.0	2
E	283L	92	3.1	126	1.3	120	0.1	2
E	283M	112	7.4	95	13.8	120	2.4	2
E	283N	102	3.8	119	7.4	135	23.4	6
E	283P	97	11.9	136	3.9	118	11.8	4
E	283Q	95	5.3	117	8.0	122	22.9	2
E	283R	102	0.3	282	8.1	144	16.7	2
E	283S	91	1.5	143	11.1	119	12.3	2
E	283T	103	3.2	143	12.4	108	11.0	2
E	283W	90	2.8	117	2.1	159	1.3	2
E	283Y	81	6.7	142	4.1	136	17.2	2
H	285N	93	2.6	202	19.8	113	21.1	4
N	286F	107	7.1	307	32.3	108	16.1	4
K	288N	110	8.7	162	13.2	118	19.1	4
K	288P	45	1.1	119	3.0	116	15.7	2
R	292A	114	2.9	85	67.5	74	21.1	4
R	292E	35	21.4	65	48.5	92	32.1	2
R	292F	73	16.4	64	7.6	101	8.3	2
R	292G	94	2.5	60	35.9	119	32.8	2
R	292I	79	1.5	56	23.6	106	3.7	2
R	292L	96	3.9	68	40.0	123	7.2	2
E	293S	68	7.4	101	23.0	98	0.1	2
E	293V	73	12.5	127	18.0	107	24.0	2
R	301W	5	105.4	119	18.1	49	31.1	4
S	304E	24	32.9	101	8.7	122	11.3	2
T	307A	87	4.4	233	14.5	115	6.5	4
T	307E	88	7.9	492	34.6	81	2.4	4
T	307M	82	5.3	302	23.7	150	6.5	4
Q	311A	106	2.4	139	7.0	89	28.3	2
Q	311D	111	6.0	38	22.2	83	13.6	2
Q	311E	102	1.7	46	17.7	78	0.7	2
Q	311F	89	6.9	64	7.5	212	20.7	2
Q	311G	98	1.9	58	21.5	92	9.6	2
Q	311I	87	8.2	437	9.6	236	11.3	8
Q	311K	80	13.4	165	5.5	170	9.3	6
Q	311L	107	6.7	186	9.2	191	8.1	4

Q	311M	97	7.2	387	15.0	252	16.3	6
Q	311N	115	1.9	54	10.5	126	23.3	2
Q	311P	99	8.0	89	300.5	172	67.9	4
Q	311R	96	8.5	14	84.5	170	14.4	2
Q	311S	86	8.8	97	10.5	0	92.8	2
Q	311T	111	10.2	131	14.0	168	23.4	2
Q	311V	108	1.7	558	19.5	240	23.3	4
Q	311W	104	8.2	215	2.8	251	18.7	4
Q	311Y	107	3.0	94	0.3	211	25.0	2
D	312P	97	1.4	546	16.1	148	11.6	2
L	314F	70	7.8	42	41.2	108	5.5	2
L	314I	83	13.0	86	22.7	184	14.2	4
L	314V	65	14.0	21	128.8	179	10.9	4
L	314W	79	11.0	5	80.2	190	2.0	4
L	314Y	87	13.6	64	81.4	238	3.2	4
N	315F	83	12.8	51	38.3	140	15.3	2
N	315K	108	3.5	88	10.2	148	8.2	2
N	315L	112	6.2	103	10.5	145	5.5	2
N	315P	62	10.2	14	289.1	231	9.1	4
N	315R	96	24.4	71	38.3	135	0.4	2
G	316F	54	26.0	34	72.4	81	10.0	2
G	316K	77	28.8	131	8.9	143	8.6	2
K	317P	54	21.5	145	1.6	190	4.7	4
K	317T	99	10.9	49	4.8	118	4.0	2
E	318N	123	7.2	216	7.5	120	7.0	4
E	318P	120	10.8	75	27.1	79	17.0	4
E	318T	109	5.7	304	56.8	118	10.5	4
E	318V	116	3.4	114	21.2	95	11.5	4
K	326W	74	17.9	93	5.7	214	9.7	2
A	327T	4	13.4	54	19.5	7	206.2	2
L	328V	76	3.2	101	6.3	56	13.9	4
P	329Y	53	41.5	107	13.2	25	90.3	4
A	330K	134	9.3	108	51.4	43	23.9	6
A	330R	103	5.5	121	39.4	31	36.6	6
I	332A	100	6.1	96	27.6	130	5.0	4
I	332D	143	3.1	78	33.7	151	11.5	6
I	332E	168	10.6	86	22.2	143	9.8	18
I	332F	97	14.5	108	3.4	149	11.0	4
I	332G	74	19.8	94	1.4	121	11.5	2
I	332H	82	4.3	129	1.1	150	11.5	2
I	332K	12	114.5	146	7.0	67	15.5	2
I	332L	94	0.9	127	2.6	154	5.1	2
I	332M	98	2.2	128	16.1	178	6.6	2
I	332N	95	15.3	92	16.1	137	5.1	4
I	332Q	99	8.4	98	7.9	148	8.5	6
I	332R	12	135.5	114	7.2	88	30.0	2

I	332S	96	4.9	263	64.1	177	16.5	2
I	332T	112	7.5	100	5.3	124	4.5	4
I	332V	109	1.1	115	19.5	147	25.1	2
I	332W	81	16.8	123	3.7	150	9.7	2
I	332Y	93	13.1	93	12.3	152	5.3	2
A	339D	131	10.4	80	26.4	183	20.3	6
A	339E	100	0.4	75	4.2	91	0.1	2
A	339F	104	3.3	120	24.6	217	8.5	6
A	339G	107	3.7	67	6.5	118	0.3	2
A	339H	114	23.4	107	10.0	136	0.5	2
A	339I	136	14.6	80	30.6	205	22.8	6
A	339K	129	24.2	83	29.0	201	21.0	6
A	339L	97	8.7	83	9.8	104	8.7	2
A	339M	115	6.8	111	7.2	57	8.8	2
A	339N	110	6.3	146	3.5	240	17.5	4
A	339Q	128	15.8	102	19.8	138	11.0	6
A	339R	117	14.4	82	13.4	128	2.1	2
A	339S	124	13.0	95	23.6	170	22.5	6
A	339T	142	14.2	138	6.2	220	20.2	10
A	339W	92	13.4	156	11.4	243	10.6	6
A	339Y	97	17.0	92	19.8	265	21.9	10
G	341D	62	6.9	52	37.8	172	3.5	2
G	341E	73	6.9	50	18.1	161	3.8	2
G	341F	24	100.8	52	41.9	227	14.7	6
G	341H	54	9.3	65	63.7	245	16.0	6
G	341I	44	15.5	36	17.2	173	5.3	2
G	341K	77	3.9	67	18.9	161	2.6	2
G	341L	64	24.3	54	19.8	171	4.2	2
G	341M	55	39.8	79	9.7	232	11.1	6
G	341N	83	9.1	53	17.0	162	9.5	2
G	341P	35	47.2	127	9.9	228	16.2	6
G	341Q	59	18.7	72	1.0	166	7.7	2
G	341R	59	14.9	78	7.4	168	7.5	2
G	341S	65	26.6	55	12.2	224	9.2	6
G	341T	0	866.0	68	54.0	176	10.0	2
G	341V	65	171.0	69	15.0	213	9.6	4
G	341W	14	25.8	76	8.9	178	8.7	2
G	341Y	26	24.5	54	5.2	184	14.3	2
P	343A	75	18.6	110	37.7	143	5.9	2
P	343D	69	11.5	102	7.9	157	18.3	2
P	343E	65	34.9	345	6.4	157	17.6	2
P	343F	74	20.6	89	13.0	99	1058.4	4
P	343G	75	29.1	110	14.9	244	11.1	6
P	343H	78	33.8	191	1.2	159	3.1	2
P	343I	92	26.8	114	16.7	86	10.5	2
P	343K	74	37.7	232	2.6	185	9.1	2

P	343L	63	17.2	125	3.8	127	5.6	2
P	343M	60	35.1	83	13.7	134	18.7	4
P	343N	67	8.9	105	19.9	196	18.2	2
P	343Q	72	0.5	442	14.0	178	3.0	2
P	343R	94	1.3	198	10.4	179	9.9	4
P	343S	84	7.5	101	14.3	207	11.9	6
P	343T	69	4.2	126	16.1	151	4.4	2
P	343V	70	1.9	77	5.3	107	12.0	2
P	343W	48	22.3	56	6.4	194	17.9	2
P	343Y	63	9.9	112	7.2	270	14.4	6
Y	373A	56	3.7	33	15.0	121	28.7	2
Y	373D	74	17.7	74	32.5	227	10.2	6
Y	373E	41	23.6	106	20.8	151	19.5	2
Y	373F	76	2.6	110	12.7	117	1.0	2
Y	373G	39	21.6	38	25.4	75	33.7	2
Y	373H	79	34.2	100	13.9	169	8.2	4
Y	373I	65	9.0	73	14.0	154	6.4	2
Y	373K	76	12.2	70	2.9	246	6.9	6
Y	373L	76	21.4	66	17.0	189	6.2	6
Y	373M	78	1.2	53	25.8	115	3.2	2
Y	373N	64	21.5	61	23.3	148	12.1	2
Y	373Q	63	11.0	55	24.7	158	17.7	2
Y	373R	81	20.5	107	24.1	221	4.0	6
Y	373S	52	3.7	74	1.9	72	24.8	2
Y	373T	70	3.0	82	16.6	151	5.7	2
Y	373V	73	2.1	69	14.3	115	1.1	2
Y	373W	77	23.3	75	18.5	237	20.8	6
S	375R	69	10.9	595	15.9	166	1.1	2
D	376A	111	18.2	155	26.7	180	5.2	2
D	376E	85	12.3	82	29.5	98	13.5	2
D	376F	84	7.3	116	12.6	119	8.6	2
D	376G	73	3.1	135	3.9	164	0.6	2
D	376H	74	16.1	81	18.6	118	5.6	2
D	376I	100	14.1	144	7.2	101	50.5	10
D	376L	88	16.7	78	3.0	142	3.2	2
D	376M	86	21.6	129	1.4	91	15.1	2
D	376N	93	14.5	94	24.2	173	14.9	4
D	376P	85	15.1	203	12.9	153	19.6	6
D	376Q	88	5.0	116	22.7	176	19.9	4
D	376R	95	6.0	103	12.3	166	4.6	2
D	376S	85	21.4	134	27.3	209	25.3	2
D	376T	102	20.0	160	11.2	224	10.1	6
D	376V	112	8.1	251	15.0	210	11.1	12
D	376W	53	22.0	1	1719.9	89	34.8	2
D	376Y	78	4.2	53	25.8	98	39.9	2
I	377G	107	2.4	76	28.8	92	7.6	2

I	377K	117	10.0	167	27.7	90	11.3	4
I	377P	99	11.3	98	32.4	245	6.5	4
A	378D	98	6.6	163	13.9	19	91.9	6
A	378N	101	7.1	180	3.0	90	30.7	2
V	379N	96	19.5	74	39.0	204	5.5	4
V	379Q	113	3.2	85	27.3	218	4.1	4
V	379S	80	18.4	86	13.4	137	1.4	2
V	379T	101	16.6	109	14.9	237	2.2	4
E	380A	106	3.2	152	28.8	139	4.2	2
E	380D	102	2.1	73	44.2	78	0.7	2
E	380N	111	7.7	142	19.0	139	7.3	2
E	380S	110	8.5	230	24.1	131	0.1	2
E	380T	100	1.2	172	11.0	115	4.8	2
E	382A	110	6.0	103	7.8	82	29.6	2
E	382D	95	0.8	73	25.7	80	34.2	2
E	382F	121	13.8	222	16.6	67	28.2	6
E	382H	89	17.9	135	2.8	84	20.4	2
E	382I	109	6.4	131	6.2	219	5.4	6
E	382K	96	2.6	153	30.2	92	15.6	4
E	382L	93	16.5	126	11.1	156	7.7	2
E	382M	89	14.6	135	8.6	126	20.3	2
E	382N	99	1.1	137	5.2	69	4.5	2
E	382P	85	16.8	122	22.0	69	14.6	2
E	382Q	105	12.2	162	12.0	140	19.3	2
E	382R	104	8.4	165	2.7	85	3.0	4
E	382S	85	2.9	151	10.0	75	4.1	2
E	382T	89	10.2	172	5.2	109	30.0	2
E	382V	83	32.5	173	6.2	167	0.4	2
E	382W	97	10.5	172	5.2	73	1.9	2
E	382Y	105	11.5	188	14.5	78	3.3	4
G	385E	108	5.5	98	18.8	0	1586.3	2
G	385P	100	3.2	101	23.2	82	15.8	2
Q	386K	96	9.5	115	4.8	266	1.6	4
F	423N	107	8.5	158	2.1	48	27.5	2
S	424H	116	29.8	97	7.3	58	9.3	2
S	424M	91	3.5	60	60.0	75	14.4	2
S	424V	103	9.3	57	35.4	115	10.5	4
S	426D	105	24.3	65	10.0	318	12.7	4
S	426L	91	35.3	117	14.3	193	20.4	4
V	427N	108	5.5	192	5.9	64	23.1	2
H	429A	44	81.7	61	11.4	147	1.9	2
H	429F	70	11.1	77	16.5	288	12.8	4
H	429M	103	0.7	83	12.2	173	3.2	2
E	430A	100	8.3	179	6.6	204	7.1	2
E	430D	96	8.2	44	25.5	190	4.6	4
E	430F	111	13.0	218	19.4	203	8.1	2

E	430G	97	7.8	131	10.6	252	7.5	6
E	430H	91	7.7	192	8.0	227	4.2	6
E	430I	87	19.3	308	6.6	297	17.2	6
E	430K	66	9.5	131	12.6	203	16.0	4
E	430L	98	33.3	242	8.7	263	10.6	6
E	430M	102	16.1	195	8.7	227	4.6	6
E	430N	82	24.6	171	13.0	162	2.2	2
E	430P	103	13.1	86	16.7	254	23.5	8
E	430Q	79	8.3	320	12.8	97	4.9	8
E	430R	75	7.5	249	6.6	227	7.9	8
E	430S	88	30.1	183	3.4	221	18.5	2
E	430T	82	22.9	137	23.7	249	8.2	6
E	430V	79	35.6	281	7.0	276	17.5	6
E	430W	78	8.3	11	95.0	171	5.4	2
E	430Y	77	44.5	126	12.5	231	na	2
A	431H	81	44.0	151	11.5	236	na	2
A	431K	98	26.6	176	4.4	113	25.0	2
A	431P	62	12.0	29	13.8	210	8.0	2
L	432R	58	23.1	38	15.6	175	13.3	2
L	432S	58	55.4	70	3.6	124	0.2	2
N	434F	na	na	1008	1.4	na	na	4
N	434G	105	17.9	358	20.2	26	128.9	4
N	434H	90	12.9	855	20.4	57	9.1	6
N	434I	81	9.3	6	725.4	73	8.9	2
N	434W	108	6.6	1335	18.8	138	1.7	2
N	434Y	106	7.7	1615	38.8	291	15.5	4
Y	436I	119	18.0	194	24.2	35	8.7	2
Y	436L	112	27.2	172	8.1	90	16.3	4
Y	436T	90	35.0	115	7.2	48	20.3	2
Q	438G	93	32.1	98	14.4	68	26.2	2
Q	438K	99	31.7	169	12.3	116	43.0	2
Q	438L	94	32.5	200	14.7	190	5.5	4
Q	438T	96	37.4	126	9.5	56	26.8	2
Q	438W	93	32.5	164	8.2	126	1.7	2
K	439E	103	28.9	94	9.0	53	40.3	2
K	439H	91	37.3	99	0.9	77	17.8	2
K	439Q	90	38.2	74	0.9	64	26.5	2
S	440A	79	42.3	82	2.0	85	22.5	2
S	440D	82	18.4	72	4.7	99	9.4	2
S	440E	104	4.0	73	2.8	87	35.3	2
S	440F	111	16.1	87	8.2	73	18.5	2
S	440G	106	1.9	101	8.1	83	8.5	2
S	440H	108	2.1	110	2.1	96	18.3	2
S	440I	121	1.9	96	6.2	86	2.6	2
S	440K	116	16.7	132	7.8	71	26.4	4
S	440L	112	6.4	126	2.2	77	4.5	4

S	440M	84	51.0	80	8.2	81	20.6	2
S	440N	78	34.3	82	25.4	108	15.8	2
S	440Q	73	43.1	81	33.5	132	16.6	2
S	440R	91	11.3	88	16.2	85	29.8	2
S	440T	89	2.1	71	39.0	115	17.4	2
S	440V	85	11.3	98	18.7	110	16.4	2
S	440W	114	17.6	85	13.8	132	14.8	2
S	440Y	109	6.8	100	14.2	224	14.1	16
S	442K	80	51.9	138	4.5	100	11.1	2

Na = no disponible o no realizado

* Por ejemplo, L235A indica una Fc en el que la leucina presente en el aminoácido de Fc número 235 (según la numeración de EU) se ha sustituido por un residuo de alanina

sometido a prueba en este caso: la región Fc es una Fc de IgG1, el anticuerpo es un anticuerpo anti-CD20.

Tabla 10 Variantes de combinación – ADCC

Variante	ADCC promedio como % de wt	% de CD	n =
Tipo natural	100	2.42	2
247A,339D	71.50	0.50	2
247F,339D	134.95	2.54	2
247H,339D	118.45	8.46	4
247I,339D	187.21	20.45	2
247L,339D	156.73	3.30	2
247T,339D	126.46	4.71	2
247Y,339D	121.93	4.58	2
247A,339H	125.35	0.60	2
247F,339H	101.54	4.53	2
247H,339H	114.24	4.91	2
247I,339H	126.94	5.22	2
247L,339H	120.92	2.44	2
247T,339H	97.96	5.71	2
247Y,339H	74.75	2.43	2

247A,339I	96.95	3.05	2
247F,339I	116.53	5.52	2
247H,339I	108.27	2.97	2
247I,339I	-4.07	-47.26	2
247L,339I	109.76	5.95	2
247T,339I	5.48	9.51	2
247Y,339I	100.84	9.58	2
247A,339K	86.90	13.51	2
247F,339K	105.85	10.11	2
247H,339K	97.59	7.67	2
247I,339K	97.41	14.89	2
247L,339K	104.36	7.07	2
247T,339K	83.02	6.07	2
247Y,339K	95.79	3.69	2
332E	180.96	0.72	2
247A,339N	83.60	9.91	2
247F,339N	100.36	8.95	2
247H,339N	86.70	7.62	2
247I,339N	119.62	13.07	2
247T,339N	114.38	4.83	4
247Y,339N	113.18	1.50	2
332E	187.19	9.53	2
247A,339Q	69.94	8.45	2
247F,339Q	130.42	2.35	2
247H,339Q	138.96	1.32	2
247I,339Q	146.44	2.27	2
247L,339Q	140.50	4.58	2
247T,339Q	119.70	4.03	2
247Y,339Q	109.40	2.24	2
247A,339R	68.57	8.33	2
247F,339R	114.38	11.85	2
247H,339R	105.46	9.89	2
247I,339R	124.96	16.31	2
247L,339R	119.77	12.03	2
247T,339R	109.42	12.17	2
247Y,339R	98.58	13.09	2
247L,339T	148.48	7.08	4

wt = tipo natural

% de CV =

n = número de muestras medidas y calculado su promedio

Tabla 11 Variantes de combinación con potenciación de ADCC

Variante de Fc	ADCC CE50 (ng/ml)
Tipo natural	6.8
247L	2.2
330K	3.1
332E	1.5
339T	3.8
247L, 330K	1.5
247L, 332E	0.73
247L, 339T	2.0
330K, 332E	0.73
330K, 339T	2.0
332E, 339T	1.0
247L, 332E, 339T	0.75
247L, 330K, 332E	0.25
247L, 330K, 339T	1.5
330K, 332E, 339T	0.25
247L, 330K, 332E, 339T	0.25

* Las actividades de ADCC se calcularon a partir de curvas de titulación

5

Tabla 12 Variantes de combinación

Mutación	ADCC	% de CV	FcRn6.0	% de CV	CDC	% de CV	n =
Tipo natural	100		100		100		
247H339D	118	8.5	N/D	N/D	N/D	N/D	4
247L251F330R332E	184	13.3	50	5.9	43	1.3	2
247L251F376I	77	29.7	61	8.7	124	11.3	2
247L332E	168	7.3	78	4.9	65	6.2	6
247L332E376I	137	8.1	74	8.0	76	4.3	4
247T339N	114	4.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
251F332E	147	12.4	72	2.2	196	2.6	6

251F332E376I	136	15.9	68	5.0	160	10.9	4
251F376I	114	8.1	66	2.9	102	9.4	4
256P311I	107	0.2	268	1.2	357	10.0	2
256P314Y332E440Y	146	3.1	86	19.5	190	4.5	2
256P314Y440Y	112	22.6	79	3.0	226	9.4	2
256P332E	174	16.3	121	8.2	189	3.9	4
256P332E440Y	184	25.4	117	6.5	230	10.0	2
256P430Q	109	2.6	150	5.3	354	3.3	4
256P434H	105	1.2	342	3.1	299	2.9	2
256P440Y	169	19.7	122	0.7	247	26.6	2
257I311I	52	7.7	409	3.9	61	6.7	2
257I311I434H	48	12.2	553	4.9	75	8.8	6
257I430Q	26	8.1	304	0.6	55	12.9	4
257I434H	67	7.0	472	6.3	61	14.0	2
268D332E	137	12.4	92	13.7	128	4.1	4
268E332E	178	5.3	88	2.0	160	4.7	4
272R279L	56	0.2	156	1.2	72	5.1	2
279A288N	107	3.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N311T318V	110	9.0	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318N	110	5.4	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318T	116	5.1	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A288N318V	118	8.8	N/D	N/D	N/D	N/D	4
279A311T318T	110	7.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
288N311T318T	115	9.9	N/D	N/D	N/D	N/D	4
311T318T	107	5.3	N/D	N/D	N/D	N/D	4
314Y332E440Y	156	5.4	82	0.9	155	0.0	2
314Y440Y	125	12.7	78	8.5	108	2.6	2
330K332D	179	2.9	88	8.3	43	0.3	2
330K332E	202	5.6	94	0.0	42	1.0	2
330R332D	152	6.3	88	6.3	44	1.5	2
330R332E	161	4.3	94	2.1	59	4.0	4
332E376I	132	8.6	102	7.6	193	5.2	6
332E376V	139	1.9	132	3.5	261	8.6	6
332E440Y	203	13.0	94	5.7	159	5.9	4
343R345D	121	16.0	143	1.6	291	3.3	2
376V430Q	92	1.5	212	4.2	256	12.2	4
376V430R	84	2.7	188	9.1	191	1.0	2
376V434H	97	3.3	382	3.3	95	6.1	4

Tabla 13 Variantes de combinación

Mutación	FcRn6.0	% de CV	n =
Tipo natural	100		

258D272R	382.8	8.2	2
258D283R	411.1	3.7	2
258D286F	445.0	1.7	2
258D307E	237.1	4.8	2
258D311I	522.0	7.0	2
258D376V	415.1	4.3	2
272R283R	439.3	21.7	2
272R286F	338.4	8.9	2
272R311I	396.1	14.4	2
272R376V	368.7	8.1	2
279D307E	522.4	8.8	2
283R307E	400.2	9.1	2
283R311I	531.3	6.1	2
283R376V	474.8	1.1	2
286F307E	431.2	3.8	2
286F311I	412.3	0.0	2
286F376V	348.9	1.5	2
307E376V	480.1	4.3	2
311I376V	413.5	39.1	2

Ejemplo 2 - Caracterización de la actividad de CDC de variantes

Este ejemplo describe cómo se determina la actividad de CDC de diversas regiones Fc variantes.

5

Este ensayo se lleva a cabo usando complemento humano (Quidel Corp., n.º de cat. Al 13) con células 15 Ramos (n.º de RA 1) (n.º de registro de ATCC CRL-1596). Se cultivan células Ramos en medios RPMI1640 de Gibco que contienen FBS al 10% a 37°C y CO₂ al 5%. El día antes del ensayo, se siembran las células a 1 x 10⁶ células en un matraz T175. Al día siguiente, se resuspenden las células hasta 3,57 x 10⁵ células/ml en RPM 11640 sin rojo de fenol que contiene FBS al 1%. Se distribuyen 70 µl de células por pocillo en una placa de fondo plano Costar 3917. Para la curva de titulación, se prepara IgG con una región Fc variante en una dilución en serie de 3 veces en medios RPMI1640. Para el ensayo de exploración de biblioteca de un único punto, se normaliza variante de IgG expresada de manera transitoria en sobrenadante de cultivo a 1 µg/ml en medios de simulación. Se añaden treinta microlitros de IgG variante (es decir, concentración final de 200 ng/ml) y 50 µl de complemento humano (Quidel Corp., n.º de cat. de A113) diluido 1:5 en RPMI 1640 + FBS al 1% a la célula diana y se mezcla bien mediante pipeteo suave. Se incuban las placas a 37°C en presencia de CO₂ al 5% durante 1,5

10

15

20

horas. Tras la adición de 15 µl/pocillo de Alamar Blue (Serotec, n.º de cat. BUF012B) continúa la incubación durante la noche. Después se mide la señal de fluorescencia mediante un lector de multidetector EnVision 2100 de PerkinElmer con excitación a 560 nm y emisión a 590 nm.

5

ii. Análisis de datos

Todos los ensayos de un único punto se realizan por duplicado. Cada placa de ensayo contiene controles para lisis de células diana espontáneas mediante complemento humano en ausencia de IgG y lisis máxima de células diana en presencia de Triton X-100 al 1%. Se incluyen tres controles de tipo natural en cada placa de ensayo y se calcula el promedio de la señal de ensayo de CDC. Se resta el valor de fondo, obtenido a partir de control de lisis espontánea, de cada muestra. Se convierten los datos de señales de fluorescencia a porcentaje de lisis específica basándose en controles de lisis espontánea y máxima. Se calcula el porcentaje de lisis específica a partir de la siguiente ecuación: porcentaje de lisis específica = (señal de fluorescencia experimental – señal espontánea)/(señal de lisis máxima – señal espontánea) X 100. Entonces se calcula el porcentaje de actividad de variante de Fc con respecto al promedio de tres controles de tipo natural. Se calcula el promedio de las actividades en porcentaje con respecto a tipo natural para placas de ensayo por duplicado y se calcula la desviación estándar entre placas de ensayo individuales.

Ejemplo 3 - Caracterización de la unión a FcRn

Este ejemplo describe ensayos para determinar la unión de receptor neonatal de Fc (FcRn) a IgG con una región Fc variante.

Se recubre una placa de ELISA de 96 pocillos con fondo en U (Costar) con 50 µl/pocillo de Neutravidin 2 µg/ml (Pierce Biotechnology, n.º de cat. 3 1000) en tampón carbonato 50 mM (pH 9,3) a 4°C durante la noche. Se retira la NeutraAvidin no unida y se lava la placa tres veces con PBST (PBS que contiene Tween 20 al 0,1%). Se aplican cincuenta microlitros de FcRn soluble marcado con biotina a 2,5 µg/ml en PBS por pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 1 h. Después se añaden 75 µl de tampón de bloqueo de caseína (Pierce Biotechnolo-

gy, n.º de cat. 37528) a la placa durante 1 hora. Entonces se lava la placa de ELISA con PBST y se incuba con 50 µl/pocillo de IgG variante. Para la curva de titulación, se prepara IgG que va a someterse a prueba mediante una dilución en serie de 3 veces en tampón de unión a FcRn (NaPO₄ 100 mM, Tween-20 al 0,05%,
 5 opcionalmente a pH diferentes (desde 6,0 hasta 7,4)). Para la selección de un único punto, se normaliza IgG variante expresada de manera transitoria en sobrenadante de cultivo hasta una concentración final de 50 ng/ml y se ajusta el pH con tampón de unión a FcRn a 6,0. En las siguientes etapas, se usa tampón de unión a FcRn a pH correspondiente para lavar la placa y diluir los reactivos. Se lleva a
 10 cabo la reacción de unión a temperatura ambiente durante 1 h. Tras tres lavados, se detecta la IgG unida mediante conjugado (Fab')₂ de cabra anti-Fab humano-HRP durante 1 h. Se desarrolla actividad HRP en sustrato de HRP de Pierce (Turbo TMB-ELISA, n.º de cat. 34022) durante 5-30 minutos. Se detiene la reacción mediante adición de 50 µl de H₂SO₄ 2 M y se lee la absorbancia a 450 nm
 15 con un lector de microplacas VMAX (Molecular Devices).

EJEMPLO 4 – Terapia de seres humanos con variante de Fc I332E anti-CD20

20 Estudios *in vitro* y modelos de tumor murinos (Clynes RA, *et al.* Nat Med. 6:443 (2000)) proporcionan evidencias de que la ADCC desempeña un papel en los efectos antitumorales de anticuerpos anti-CD20, tales como RITUXAN. Puede tratarse a pacientes humanos con anticuerpos de variante de Fc I332E anti-CD20 o RITUXAN, de una manera similar a la dada a conocer en Cartron *et al.*, Blood
 25 99:754 (2002). Por ejemplo, pacientes que presentan enfermedad en estadio II a IV según la clasificación de Ann-Arbor, que tienen al menos un sitio de enfermedad medible, y baja carga tumoral según los criterios de GELF, pueden tratarse con un total de cuatro dosis de aproximadamente 375 mg/m² de una variante de Fc anti-CD20 o con RITUXAN administrados mediante infusión intravenosa (días
 30 1, 8, 15 y 22). El criterio de valoración de la eficacia principal es la tasa de respuesta objetiva, es decir, la proporción de pacientes que alcanzan o bien remisión completa (RC), o bien RC no confirmada (RCnc) o bien respuesta parcial (RP) según criterios recientemente propuestos por un comité de expertos internacional.

La respuesta clínica puede evaluarse en el mes dos (M2). También puede evaluarse a los pacientes para determinar la progresión a 1 año (M12).

Pueden compararse las tasas de respuesta objetiva a M2 y M12 para pacientes
5 tratados con RITUXAN o variante de Fc anti-CD20 de tal manera que puedan cuantificarse las actividades ADCC mejoradas proporcionadas por una variante de Fc. Puede repetirse el mismo ejemplo con otras variantes anti-CD20 (véanse, por ejemplo, las tablas 1-10 en el presente documento).

10 Adicionalmente, la potencia potenciada de las variantes puede permitir diferentes vías de administración, inyecciones menos frecuentes y/o administración de dosis menores.

Lista de secuencias

15 <110> Applied Molecular Evolution (AME)

<120> Regiones Fc variantes

<130> x16877

<140> Documento US 60/643.718

<141> 13-01-2005

20 <150> Documento US 60/638.442

<151> 23-12-2004

<150> Documento US 60/609.101

<151> 09-10-2004

<150> Documento US 60/604.339

25 <151> 25-08-2004

<150> Documento US 60/602.953

<151> 19-08-2004

<150> Documento US 60/598.855

<151> 08-04-2004

30 <160> 36

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
35 40 45
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
100 105 110
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
130 135 140
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
195 200 205
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

5 <210> 2

<211> 217

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 3

<211> 218

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ES 2 426 816 T3

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp
35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
50 55 60

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
100 105 110

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
115 120 125

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn
145 150 155 160

Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
180 185 190

Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr
195 200 205

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 4

<211> 218

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
 35 40 45
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 50 55 60
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 85 90 95
 Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 100 105 110
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 115 120 125
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 180 185 190
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 195 200 205
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

<210> 5

<211> 215

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 5

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 1 5 10 15
 Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val
 20 25 30
 Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
 35 40 45
 Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 50 55 60
 Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp
 65 70 75 80
 Cys Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe
 85 90 95
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys
 100 105 110
 Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys
 115 120 125
 Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp
 130 135 140
 Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
 145 150 155 160
 Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
 165 170 175
 Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
 180 185 190
 Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
 195 200 205
 Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 6

<211> 218

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 6

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 35 40 45
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 85 90 95
 Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 100 105 110
 Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
 115 120 125
 Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
 130 135 140
 Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 165 170 175
 Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
 180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 210 215

<210> 7

<211> 218

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 7

ES 2 426 816 T3

Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
 35 40 45
 Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
 50 55 60
 Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser His Leu Pro Ile Gln
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 85 90 95
 Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 100 105 110
 Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln
 115 120 125
 Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn
 130 135 140
 Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
 165 170 175
 Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp
 180 185 190
 Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu
 195 200 205
 Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 8

<211> 218

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 8

ES 2 426 816 T3

Pro Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 20 25 30
 Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His Val Ser Trp
 35 40 45
 Phe Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln Pro Arg Glu
 50 55 60
 Ala Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
 65 70 75 80
 His Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
 85 90 95
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
 100 105 110
 Arg Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln
 115 120 125
 Met Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe
 130 135 140
 Ser Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln
 145 150 155 160
 Asp Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe
 165 170 175
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu
 180 185 190
 Ile Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr
 195 200 205
 Gln Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 9

<211> 110

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
50 55 60

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
85 90 95

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
100 105

<210> 11

<211> 330

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

ES 2 426 816 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

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

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 13

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 13

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe

10 <210> 14

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Constructo sintético

<400> 14

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp
100 105 110

<210> 15

<211> 97

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 15

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile
20 25 30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

10 Phe

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 16

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

Ser val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

5 Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
100 105 110

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Constructo sintético

<400> 17

Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Ile His
1 5 10

<210> 18

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

20 <400> 18

Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser
1 5

<210> 19

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Constructo sintético
 <400> 19
 Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 20
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 20
 15 Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10
 <210> 21
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 21
 Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser Lys
 1 5 10 15
 Leu
 <210> 22
 25 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 30 <400> 22
 Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 23
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
 1 5 10
 <210> 24
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 24
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 25
 <211> 9
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 25
 Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr
 1 5
 25 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Constructo sintético
 <400> 26
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His
 1 5 10

- <210> 27
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 27
 Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 28
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 15 <400> 28
 Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 213
 <212> PRT
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Constructo sintético
 <400> 29

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Pro Tyr Ile
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Ala Thr Ser Ala Leu Ala Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Leu Ser Asn Pro Pro Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 30

<211> 642

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 30

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagctc aagtgtaccg tacatccact ggtaccagca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctcctcat ctatgccaca tccgctctgg cttctggcat cccagacagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagact ggagcctgaa 240
 gatTTTgcag tgtattactg tcagcagtgg ctgagtaacc caccacttt tggccagggg 300
 accaagctgg agatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tcttcattct cccgccatct 360
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 31

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 31

ES 2 426 816 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
 50 55 60
 Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Gln Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 32

<211> 1356

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 32

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60
 tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcaactgggt gcgccagatg 120
 cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac 180
 aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240
 ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact 300
 tacgtgggcg gtgactggca gttcgatgtc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcggctctc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaagggtgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa atcaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaacaga aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca ccctgcccc atcccgggac 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1356

<210> 33

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 33

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Met His Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Leu Thr Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Ser
 50 55 60
 Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 34

<211> 1356

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 34

gagggtgcagc tgggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccgggggagtc tctgaagatc	60
tcctgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcactgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac	180
aatcagaagt cgaaactcca gggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact 300
 tacgtgggcg gtgactggca gttcgatgtc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg 600
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa atcaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tgggtacgtg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagaca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggac 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga 1356

<210> 35

<211> 451

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 35

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Arg Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

ES 2 426 816 T3

Lys Leu Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Thr Tyr Val Gly Gly Asp Trp Gln Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 36

<211> 1356

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 36

gaggtgcagc tggtagcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc	60
tcttgtaagg gttctggccg tacatttacc agttacaata tgcactgggt gcgccagatg	120
cccgggaaag gcctggagtg gatgggggct atttatccct tgacgggtga tacttcctac	180
aatcagaagt cgaaactcca ggtcaccatc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac	240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagatcgact	300
tacgtgggcg gtgactggca gttcgatgtc tggggcaagg ggaccacggt caccgtctcc	360
tcagcctcca ccaaggggcc atcgggtctc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct	420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	480
tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacag	600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggttgag	660
cccaaactct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg	720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac	900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc	960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc	1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggac	1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac	1140
atcgacgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac	1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga	1356

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo anti-CD20 que comprende:
 - 5 (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 13;
 - (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 14; y
 - 10 (c) una variante de una región Fc original, en el que la región Fc original es una región Fc de IgG1 humana y en el que la región Fc variante comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en 247I/339Q y 247I/339D.
- 15 2. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1, en el que la región Fc original es una región Fc de IgG1 humana nativa.
3. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el
20 que la variante de Fc es 247I/339Q.
4. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la variante de Fc es 247I/339D.
- 25 5. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 3, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 29 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 31.
- 30 6. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 5, en el que la cadena ligera se codifica por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 y la cadena pesada se codifica por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 32.

7. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 4, que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 29 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 33.
- 5 8. Anticuerpo anti-CD20 según la reivindicación 7, en el que la cadena ligera se codifica por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 30 y la cadena pesada se codifica por una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 34.
- 10 9. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 11. Anticuerpo anti-CD20 según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para su uso en el tratamiento de linfoma.

FIG. 1

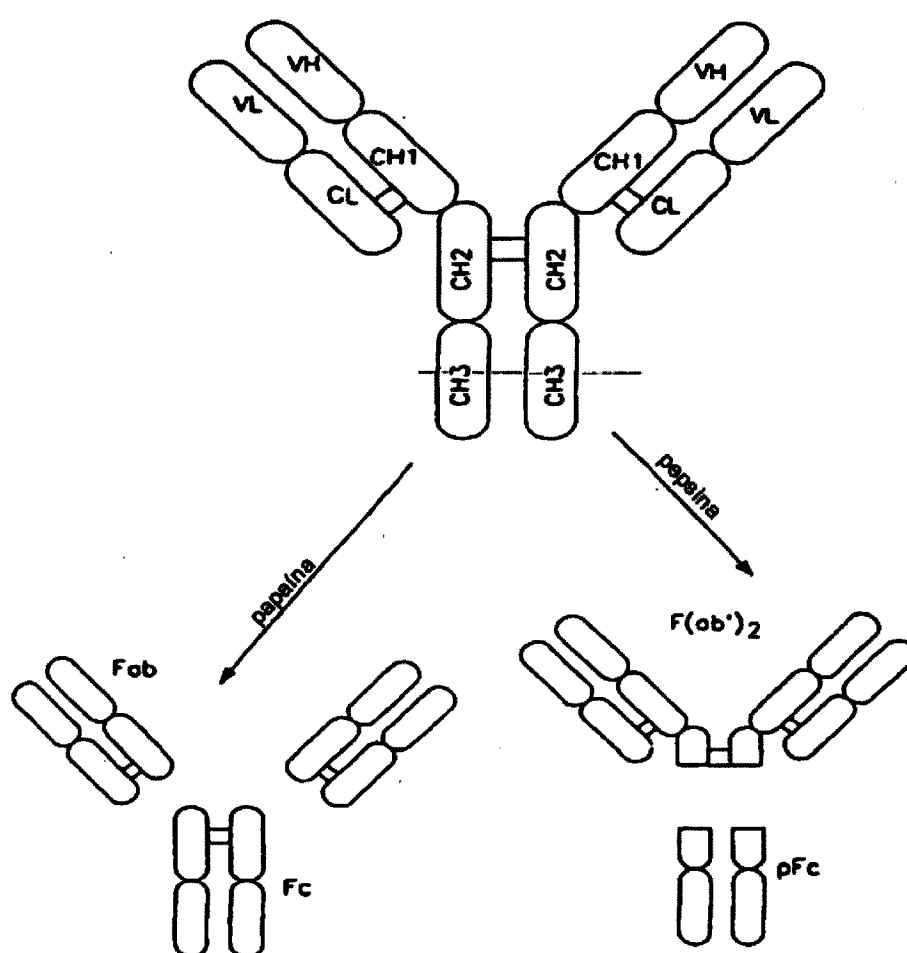


FIG. 2

humIgG1	230	PAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMI	280	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDM	DGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDM
humIgG2		PAP - PVAGPSVFLPPPKPKDTLMI		DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS	DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS
humIgG3		PAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMI		DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS	DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS
humIgG4		PAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMI		DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS	DGVEVHNATKPREEQFNSTFRVVS
murIgG1		... TVEVSSVFI		DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS	DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
murIgG2A		PAPNLLGGPSVFI		DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS	DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
murIgG2B		PAPNLLGGPSVFI		DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS	DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
murIgG3		PPGNILGGPSVFI		DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS	DPVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
humIgG1	330	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP	380	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG2		APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG3		APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG4		SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG1		APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG2A		APIERTISKPKGSVRAPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG2B		SPIERTISKPKGLVRAPQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG3		APIERTISKPKGRAQTQVYTLPP		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG1	430	EALAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG2		EALAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG3		EALAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
humIgG4		EALAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG1		EGLAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG2A		EGLAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG2B		EGLAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
murIgG3		EGLAHNYTQKLSLSLSPGK		EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS	EMESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS

FIG. 3

A. CH2 original (SEQ ID NO:9)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

B. CH3 original (SEQ ID NO:10)

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

C. Polipéptido original (alotipo f) (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

D. Polipéptido original (alotipo a, z) (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 4

A. (SEQ ID NO: 13)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASSSV YIHWYQOKPG QAPRLLIYAT
SALASGIPDR FSGSGSGTDF TLTISRLEPE DFAVYYCQOW LSNPPTF

B. (SEQ ID NO: 14)

EVQLVQSGAE VKKPGESLKI SCKGSGRTFT SYNMHWVRQM PGKGLEWMGA
IYPLTGDTSY NQKSKLQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARST
YVGGDWQFDV W

C. LCVR de anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 15)

QIVLSQSPAI LSASPGEKVT MTCRASSSVS YIHWYQOKPG SSPKPWIYAT
SNLASGVPVR FSGSGSGTSY SLTISRVEAE DAATYYCQOW TSNPPTF

D. HCVR de anti-CD20 (II) (SEQ ID NO: 16)

QVQLQQPGAE LVKAGASVKM SCKASGYTFT SYNMHWVKQT PGRGLEWIGA
IYPGNGDTSY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARST
YYGGDWYFNV W

E. Anti-CD20 (I)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 17): RASSSVPIYH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 18): ATSALAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 19): QQWLSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 20): GRTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 21): AIYPLTGDTSYNQKSKL
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 22): STYVGGDWQFDV

Anti-CD20 (II)

LCVR CDR1 (SEQ ID NO: 23): RASSSVSYIH
LCVR CDR2 (SEQ ID NO: 24): ATSNLAS
LCVR CDR3 (SEQ ID NO: 25): QQWTSNPPT

HCVR CDR1 (SEQ ID NO: 26): GYTFTSYNMH
HCVR CDR2 (SEQ ID NO: 27): AIYPGNGDTSYNQKFKG
HCVR CDR3 (SEQ ID NO: 28): STYYGGDWYFNV

FIG. 5**A. SEQ ID NO:29: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera completa de AME 13s**

EIVLTQSPGTL^{SL}SPGERATL^{SCR}ASSSV^{PYI}HWYQ^{QK}PGQAP^{RLL}IYATSALASGIPDR
 FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQ^{QW}LSNPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASV^{VCL}LNNFY^PPREAKVQ^{WK}VDNALQ^{SG}NSQESVTEQDSK^DSTYSL^SSTLT^L
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

- La región constante está subrayada

B. SEQ ID NO:30: Secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera completa de AME 133

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACC
 CTCTCCTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTACCGTACATCCACTGGTACCAGCAGAAACCTGGC
 CAGGGT^{EEEE}AGGCT^{ECT}CA^{TCT}ATG^{CA}EA^{TC}GG^{ET}CTGG^{ET}TCTGGC^{AT}EE^{CA}GACAGG
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA
 GATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTGGCTGAGTAACCCACCCACTTTTGGCCAGGGG
 ACCAAGCTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
 GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC
 AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAG
 AGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG
 AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

FIG. 6**A. SEQ ID NO:31: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de AME 133 (variante 247I/339Q)**

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
 NQKSKLQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKQKGPQPREPOVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

- La región constante está subrayada; las variantes están en negrita

B. SEQ ID NO: 32: Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de AME 133 (variante 247I/339Q)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAAGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCTAC
 AATCAGAAGTCGAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGAGACAAACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAGCGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAACAGAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGA
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- Las variantes están en negrita y subrayadas

FIG. 6

C. SEQ ID NO:33: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de AME 133 (247I/339D)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
 NQKSKLQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKIKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKDKGQPREPOVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- La región constante está subrayada; las variantes están en negrita

D. SEQ ID NO: 34: Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de AME 133 (247I/339D)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAGGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCTTAC
 AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCGAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAATCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAGACAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC
 ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGACAAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- Las variantes están en negrita y subrayadas

FIG. 6

E. SEQ ID NO:35: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada completa de AME 133 (378D)

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGRTFTSYNMHWVRQMPGKGLEWMGAIYPLTGDTSY
 NQSKSLQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARSTYVGGDWQFDVWGKGTTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIDVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

- La región constante está subrayada; la variante está en negrita

F. SEQ ID NO: 36: Secuencia de ácido nucleico de la cadena pesada completa de AME 133 (378D)

GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCTCTGAAGATC
 TCCTGTAAGGGTTCTGGCCGTACATTTACCAGTTACAATATGCACTGGGTGCGCCAGATG
 CCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGGCTATTTATCCCTTGACGGGTGATACTTCCTAC
 AATCAGAAGTCGAAACTCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTAC
 CTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATGTATTACTGTGCGAGATCGACT
 TACGTGGGCGGTGACTGGCAGTTCGATGTCTGGGGCAAGGGGACCACGGTCACCGTCTCC
 TCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCT
 GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG
 TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCC
 TCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG
 ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTTGAG
 CCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
 GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC
 CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC
 TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC
 AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
 AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATC
 TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAC
 GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC
 ATCGACGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCC
 GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG
 TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

- La variante está en negrita y subrayada