

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 340**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2005 E 11188573 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2471813**

54 Título: **Variantes de Fc optimizadas**

30 Prioridad:

12.11.2004 US 627774 P

10.11.2004 US 626991 P

09.11.2004 US 627026 P

20.07.2004 US 589906 P

05.05.2004 US 568440 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2015

73 Titular/es:

**XENCOR, INC. (100.0%)
111 W. Lemon Avenue
Monrovia, CA 91016, US**

72 Inventor/es:

**LAZAR, GREGORY ALAN;
DANG, WEI;
DESJARLAIS, JOHN R.;
KARKI, SHER BAHADUR;
VAFA, OMID y
HAYES, ROBERT**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 530 340 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

Variantes de Fc optimizadas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas variantes de la Fc optimizadas, particularmente métodos de modificación para su generación, y su aplicación, particularmente para fines terapéuticos.

10 Antecedentes de la invención

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras apareadas. Cada cadena se compone de dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales, y por lo tanto el término genérico inmunoglobulina se utiliza para tales proteínas. Cada cadena está compuesta de dos regiones distintas, referidas como las regiones variable y constante. Las regiones variables de cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos, y son responsables de la unión al antígeno objetivo. Las regiones constantes muestran una menor diversidad de secuencia, y son responsables de la unión de un número de proteínas naturales para inducir eventos bioquímicos importantes. En humanos existen cinco clases diferentes de anticuerpos que incluyen IgA (que incluyen las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluyen las subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), e IgM. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque puedan existir diferencias sutiles en la región variable. La Figura 1 muestra un anticuerpo IgG1, usado aquí como un ejemplo para describir las características estructurales generales de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos IgG son proteínas tetraméricas compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada de IgG se compone de cuatro dominios de inmunoglobulinas unidos del N- al C-terminal en el orden $V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$, con referencia al dominio pesado variable, al dominio pesado constante 1, al dominio pesado constante 2 y al dominio pesado constante 3. Los dominios C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} de las IgG se conocen, además, como dominio constante gamma 1 ($C\gamma 1$), dominio constante gamma 2 ($C\gamma 2$) y dominio constante gamma 3 ($C\gamma 3$) respectivamente. La cadena ligera de la IgG se compone de dos dominios de inmunoglobulina unidos del N- al C-terminal en el orden V_L-C_L , en referencia al dominio variable de cadena ligera y al dominio constante de la cadena ligera, respectivamente.

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión al antígeno de la molécula, y así determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno objetivo. La región variable se nombra así porque es la más distinta en la secuencia de otros anticuerpos de la misma clase. La mayoría de la variabilidad de secuencia se produce en las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs). Hay 6 CDR en total, tres por cada cadena pesada y ligera, designadas V_H CDR1, V_H CDR2, V_H CDR3, V_L CDR1, V_L CDR2, y V_L CDR3. La región variable fuera de las CDR se refiere como región marco (FR). Aunque no son tan diversos como los CDR, la variabilidad de la secuencia sí ocurre en la región FR entre diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un andamio estable (la región FR) sobre el cual puede explorarse la diversidad de unión al antígeno sustancial (las CDR) por el sistema inmune para obtener especificidad para un amplio conjunto de antígenos. Un número de estructuras de alta resolución están disponibles para una variedad de fragmentos de la región variable de diferentes organismos, algunos no unidos y algunos en complejos con el antígeno. Las características estructurales y secuencias de las regiones variables de anticuerpo están bien caracterizadas (Morea y otros, 1997, Biophys Chem 68:9-16; Morea y otros, 2000, Methods 20:267-279), y las características conservadas de los anticuerpo han permitido el desarrollo de una gran cantidad de técnicas de modificación de los anticuerpos (Maynard y otros, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-376). Por ejemplo, es posible injertar las CDR de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo murino, en la región marco de otro anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo humano. Este proceso, conocido en la técnica como "humanización", permite la generación de anticuerpos terapéuticos menos inmunogénicos a partir de anticuerpos no humanos. Los fragmentos que comprenden la región variable pueden existir en la ausencia de otras regiones del anticuerpo, que incluyen por ejemplo el fragmento de unión al antígeno (Fab) que comprende $V_H-C\gamma 1$ y V_H-C_L , el fragmento variable (Fv) que comprende V_H y V_L , el fragmento variable de cadena sencilla (scFv) que comprende V_H y V_L unidos entre sí en la misma cadena, así como una variedad de otros fragmentos de la región variable (Little y otros, 2000, Immunol Today 21:364-370).

La región Fc de un anticuerpo interactúa con un número de receptores y ligandos de Fc, impartiendo un conjunto de capacidades funcionales importantes referidas como funciones efectoras. Para la IgG la región Fc, como se muestra en la Figura 1, comprende dominios Ig $C\gamma 2$ y $C\gamma 3$ y la región bisagra del N-terminal que conduce a $C\gamma 2$. Una familia importante de receptores Fc para la clase IgG son los receptores gamma Fc (Fc γ Rs). Estos receptores median la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmune. (Raghavan y otros, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ravetch y otros, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). En humanos esta familia de proteínas incluye Fc γ RI (CD64), que incluyen las isoformas Fc γ RIa, Fc γ RIb, y Fc γ RIc; Fc γ RII (CD32), que incluyen las isoformas Fc γ RIIIa (que incluyen los alotipos H131 y R131), Fc γ RIIb (que incluyen Fc γ RIIb-1 y Fc γ RIIb-2) y Fc γ RIIc; y Fc γ RIII (CD16), que incluyen las isoformas Fc γ RIIIa (que incluyen los alotipos V158 y F158) y Fc γ RIIIb (que incluyen los alotipos Fc γ RIIIb-NA1 y Fc γ RIIIb-NA2) (Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65). Estos receptores típicamente tienen un dominio

extracelular que media la unión a Fc, una región que se extiende en la membrana y un dominio intracelular que puede mediar algunos eventos de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T $\gamma\delta$. La formación del complejo Fc/Fc γ R recluta estas células efectoras a sitios de unión al antígeno, que resultan típicamente en eventos de señalización dentro de las células y respuestas inmunes subsecuentes importantes tales como la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La habilidad de mediar funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial por el cual los anticuerpos destruyen las células objetivo. La reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc γ R reconocen el anticuerpo unido sobre una célula objetivo y subsecuentemente causan la lisis de la célula objetivo se refiere como citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) (Raghavan y otros, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie y otros, 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766; Ravetch y otros, 2001, Annu Rev Immunol 19:275-290). La reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan Fc γ R reconocen el anticuerpo unido a una célula objetivo y subsecuentemente causan fagocitosis de la célula objetivo se refiere como fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP). Un número de estructuras se han solucionado de los dominios extracelulares de Fc γ Rs humanos, incluyendo Fc γ RIIa (código de acceso a pdb 1 H9V) (Sondermann y otros, 2001, J Mol Biol 309:737-749) (código de acceso a pdb 1 FCG) (Maxwell y otros, 1999, Nat Struct Biol 6:437-442), Fc γ RIIb (código de acceso a pdb 2FCB) (Sondermann y otros, 1999, Embo J 18:1095-1103); y Fc γ RIIIb (código de acceso a pdb 1E4J) (Sondermann y otros, 2000, Nature 406:267-273). Todos los Fc γ Rs se unen a la misma región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cy2 y la bisagra precedente, que se muestra en la Figura 2. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann y otros, 2001, J Mol Biol 309:737-749), y varias estructuras de la Fc humana unidas al dominio extracelular de Fc γ RIIIb humano se han resuelto (código de acceso a pdb 1E4K) (Sondermann y otros, 2000, Nature 406:267-273) (código de acceso a pdb 1IIS and 1IIX) (Radaev y otros, 2001, J Biol Chem 276:16469-16477), así como también tiene la estructura del complejo IgE Fc/Fc ϵ RI α humano (código de acceso a pdb 1 F6A) (Garman y otros, 2000, Nature 406:259-266).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los Fc γ R, IgG1 e IgG3 típicamente se unen sustancialmente mejor a los receptores que IgG2 e IgG4. Todos los Fc γ R se unen a la misma región en el Fc de las IgG, pero con diferentes afinidades: el ligando de alta afinidad de Fc γ RI tiene una Kd para la IgG1 de 10^{-8} M⁻¹, mientras que los receptores de baja afinidad Fc γ RII y Fc γ RIII generalmente se unen a 10^{-6} y 10^{-5} respectivamente. Los dominios extracelulares de Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb son idénticos en un 96%, sin embargo Fc γ RIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, por cuanto Fc γ RI, Fc γ RIIa/c, y Fc γ RIIIa son reguladores positivos de la activación provocada por el complejo inmune, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación basado Fc γ RIIb en el inmunoreceptor de tirosina (ITAM), tiene un motivo de inhibición basado en el inmunoreceptor de tirosina (ITIM) y es por lo tanto inhibitorio. Así los primeros se refieren como receptores de activación y Fc γ RIIIb se refiere como un receptor inhibitorio. Los receptores difieren además en el patrón de expresión y los niveles en diferentes células inmunes. Aún otro nivel de complejidad es la existencia de un número de polimorfismos de Fc γ R en el proteoma humano. Un polimorfismo particularmente relevante con importancia clínica es Fc γ RIIIa V158/F158. La IgG1 humana se une con mayor afinidad al alotipo V158 que al alotipo F158. Se ha demostrado que esta diferencia en afinidad, y presumiblemente su efecto sobre la ADCC y/o la ADCP, es un determinante significativo de la eficacia del anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®, una marca registrada de IDEC Pharmaceuticals Corporation). Los pacientes con el alotipo V158 responden favorablemente al tratamiento con rituximab; sin embargo, los pacientes con el alotipo de menor afinidad F158 responden mal (Cartron y otros, 2002, Blood 99:754-758). Aproximadamente el 10-20% de los seres humanos son V158/V158 homocigotos, el 45% son V158/F158 heterocigotos, y el 35-45% de los seres humanos son F158/F158 homocigotos (Lehrnbecher y otros, 1999, Blood 94:4220-4232; Cartron y otros, 2002, Blood 99:754-758). Así, el 80-90% de los seres humanos son malos respondedores, es decir que tienen al menos un alelo del Fc γ RIIIa F158.

Un sitio solapado pero separado en el Fc, mostrado en la Figura 1, sirve como la interfase para la proteína del complemento C1q. En el mismo sentido que la unión Fc/Fc γ R media la ADCC, la unión Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q forma un complejo con las serina proteasas C1r y C1s para formar el complejo C1. C1q es capaz de unir seis anticuerpos, aunque la unión a dos IgG es suficiente para activar la cascada del complemento. Similar a la interacción del Fc con Fc γ R, diferentes subclases de IgG tienen diferente afinidad por C1q, típicamente IgG1 e IgG3 se unen sustancialmente mejor a Fc γ R que IgG2 e IgG4. Actualmente no existe una estructura disponible para el complejo Fc/C1q; sin embargo, los estudios de mutagénesis mapearon el sitio de unión en la IgG humana para C1q para una región que involucra los residuos D270, K322, K326, P329, y P331, y E333 (Idusogie y otros, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Idusogie y otros, 2001, J Immunol 166:2571-2575).

Un sitio en Fc entre los dominios Cy2 y Cy3, mostrado en la Figura 1, media la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión al cual recicla al anticuerpo endocitado desde el endosoma regresando a la corriente sanguínea (Raghavan y otros, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie y otros, 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766). Este proceso, acoplado con la exclusión de la filtración del riñón debido a la gran talla de la molécula en toda su extensión, resulta favorable a la duración del tiempo de vida media del anticuerpo en suero en el intervalo de una a tres

semanas. La unión de Fc a FcRn juega también un papel clave en el transporte del anticuerpo. El sitio de unión para FcRn en Fc es además el sitio al cual se unen las proteínas bacterianas A y G. La fuerte unión por estas proteínas se explota típicamente como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de proteínas. Así la fidelidad de esta región en el Fc es importante tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos como para su purificación. Estructuras Disponibles del complejo Fc/FcRn de rata (Martin y otros, 2001, *Mol Cell* 7:867-877,), y los complejos de Fc con proteínas A y G (Deisenhofer, 1981, *Biochemistry* 20:2361-2370; Sauer-Eriksson y otros, 1995, *Structure* 3:265-278; Tashiro y otros, 1995, *Curr Opin Struct Biol* 5:471-481) proporcionan una idea de la interacción de Fc con estas proteínas.

Una característica clave de la región Fc es la N glicosilación conservada que se produce en N297, mostrada en la Figura 1. Este carbohidrato, u oligosacárido como se refiere algunas veces, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales por lo que los anticuerpos tienen que ser producidos mediante el uso de sistemas de expresión de mamíferos. Aunque no se desea estar limitados a una teoría, se cree que el propósito estructural de este carbohidrato puede ser para estabilizar o solubilizar el Fc, determinar un ángulo específico o nivel de flexibilidad entre los dominios Cy3 y Cy2, evitar la agregación de los dos dominios Cy2 entre sí a través del eje central, o una combinación de éstos. La unión eficiente de Fc a FcγR y C1q requiere esta modificación, y alteraciones en la composición del carbohidrato en N297 o su eliminación afecta la unión a estas proteínas (Umaña y otros, 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies y otros, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Mimura y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:45539-45547.; Radaev y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:16478-16483; Shields y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:6591-6604; Shields y otros, 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Simmons y otros, 2002, *J Immunol Methods* 263:133-147). Sin embargo, el carbohidrato tiene poco o ningún contacto específico con los FcγR (Radaev y otros, 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477), lo que indica que el papel funcional del carbohidrato de N297 en la mediación de la unión Fc/FcγR puede ser a través del papel estructural que desempeña en la determinación de la conformación del Fc. Esto se apoya por una colección de estructuras cristalinas de cuatro glicofomas de Fc diferentes, que muestran que la composición del oligosacárido tiene un impacto en la conformación de Cy2 y como resultado en la interfase Fc/FcγR (Krapp y otros, 2003, *J Mol Biol* 325:979-989).

Las características de anticuerpos discutidas anteriormente - especificidad por el objetivo, capacidad para mediar los mecanismos efectores inmunológicos, y una larga vida media en el suero - hacen que los anticuerpos sean agentes terapéuticos potentes. Los anticuerpos monoclonales se usan terapéuticamente para el tratamiento de una variedad de afecciones que incluyen cáncer, inflamación y enfermedad cardiovascular. Actualmente existen más de diez productos de anticuerpos en el mercado y cientos en desarrollo. Además de los anticuerpos, se encontró que una proteína similar al anticuerpo que tiene un papel creciente en la investigación y la terapia es la fusión Fc (Chamow y otros, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200). Una fusión Fc es una proteína en donde uno o más polipéptidos está unida operativamente a Fc. Una fusión Fc combina la región Fc de un anticuerpo y de este modo es favorable a funciones efectoras y farmacocinéticas, con la región de unión al objetivo de un receptor, ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. El papel del último es mediar el reconocimiento del objetivo y de este modo es análogo funcionalmente a la región variable del anticuerpo. Debido al solapamiento estructural y funcional de las fusiones de Fc con los anticuerpos, la discusión sobre anticuerpos en la presente invención se extiende directamente a las fusiones Fc.

Existe un número de posibles mecanismos por los cuales los anticuerpos destruyen las células tumorales, que incluyen la anti-proliferación a través del bloqueo de vías de crecimiento necesarias, la señalización intracelular que conduce a la apoptosis, el aumento de la regulación negativa y/o recambio de receptores, la CDC, la ADCC, la ADCP, y la promoción de una respuesta inmune adaptativa (Cragg y otros, 1999, *Curr Opin Immunol* 11:541-547, Glennie y otros, 2000, *Immunol Today* 21:403-410). La eficacia antitumoral puede deberse a una combinación de estos mecanismos, y su importancia relativa en la terapia clínica parece ser dependiente del cáncer. A pesar de este arsenal de armas antitumorales, la potencia de los anticuerpos como agentes contra el cáncer no es satisfactoria, particularmente debido a su alto costo. Datos de la respuesta tumoral de pacientes muestran que los anticuerpos monoclonales sólo proporcionan una pequeña mejora del éxito terapéutico sobre los quimioterapéuticos citotóxicos como agentes únicos normales. Por ejemplo, sólo la mitad de los pacientes con linfoma no Hodgkin de bajo grado de recaída responde al anticuerpo anti-CD20 rituximab (McLaughlin y otros, 1998, *J Clin Oncol* 16:2825-2833). De 166 pacientes clínicos, el 6% mostró una respuesta completa y el 42% mostró una respuesta parcial, con una duración promedio de la respuesta de aproximadamente 12 meses. Trastuzumab (Herceptin®, una marca registrada de Genentech), un anticuerpo anti-HER2/neu para el tratamiento de cáncer de mama metastásico, tiene menos eficacia. La tasa de respuesta global usando trastuzumab, en los 222 pacientes probados fue sólo 15%, con 8 respuestas completas y 26 parciales y una duración promedio de respuesta y supervivencia de 9 a 13 meses (Cobleigh y otros, 1999, *J Clin Oncol* 17:2639-2648). Actualmente para la terapia contra el cáncer, cualquier pequeña mejora en la tasa de mortalidad define el éxito. Así, existe una necesidad significativa de mejorar la capacidad de los anticuerpos para destruir células cancerosas específicas.

El papel de las funciones efectoras mediadas por FcγR en la actividad anti-cáncer de anticuerpos se ha demostrado en ratones (Clynes y otros, 1998, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:652-656; Clynes y otros, 2000, *Nat Med* 6:443-446), y la

afinidad de interacción entre Fc y ciertos FcγRs correlaciona con la citotoxicidad objetivo en los ensayos basados en célula (Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740). Además, se observó una correlación entre la eficacia clínica en humanos y su alotipo de formas polimórficas de afinidad alta (V158) o baja (F158) de FcγRIIIa (Cartron y otros, 2002, Blood 99:754-758).

Los estudios de mutagénesis se llevaron a cabo en Fc hacia diferentes objetivos, con sustituciones realizadas normalmente a alanina (denominada barrido de alanina) o guiadas por sustituciones de homología entre secuencia (Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564; Lund y otros, 1991, J Immunol 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Jefferis y otros, 1995, Immunol Lett 44:111-117; Lund y otros, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y otros, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604) (US 5,624,821; US 5,885,573; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572). La mayoría de las sustituciones reduce o produce ablación de la unión con FcγRs. Sin embargo cierto éxito se ha logrado con la obtención de variantes de la Fc con una afinidad por FcγR superior. (Ver, por ejemplo, US 5,624,821 y PCT WO 00/42072). Por ejemplo, Winter y colegas sustituyeron el aminoácido humano en la posición 235 de anticuerpo IgG2b de ratón (una mutación de ácido glutámico a leucina) que aumentó la unión de anticuerpo de ratón a FcγRI humano en 100-veces (Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564) (US 5,624,821). Shields y otros usaron mutagénesis de barrido de alanina para mapear los residuos Fc importantes para la unión al FcγR, seguido por la sustitución de los residuos seleccionados sin mutaciones de alanina (Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490) (PCT WO 00/42072).

Una afinidad mejorada de Fc para FcγR también se ha conseguido utilizando glicofomas modificadas generadas por la expresión de anticuerpos en líneas celulares variantes o modificadas (Umaña y otros, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies y otros, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473). Este enfoque ha generado una mejora de la capacidad de los anticuerpos para unirse al FcγRIIIa y para mediar la ADCC.

Otra desventaja importante de los anticuerpos son sus exigentes necesidades de producción (Garber, 2001, Nat Biotechnol 19:184-185; Dove, 2002, Nat Biotechnol 20:777-779). Los anticuerpos deben expresarse en células de mamíferos, y los anticuerpos comercializados en la actualidad junto con otros agentes bioterapéuticos de alta demanda consumen prácticamente toda la capacidad de producción disponible. Con cientos de productos biológicos en desarrollo, la mayoría de los cuales son anticuerpos, existe una necesidad urgente de métodos de producción más eficientes y más baratos. Los efectos derivados de una insuficiente capacidad de producción de anticuerpos son tres. En primer lugar, aumenta dramáticamente el costo de los bienes para el productor, un costo que se transmite al paciente. En segundo lugar, dificulta la producción industrial de productos de anticuerpos aprobados, lo que limita la disponibilidad de terapias de alta demanda para los pacientes. Por último, debido a que los ensayos clínicos requieren grandes cantidades de una proteína que aún no es rentable, el suministro insuficiente impide el progreso de la creciente cartera de proyectos de anticuerpos al mercado.

Se han explorado métodos de producción alternativos en intentos de aliviar este problema. Se está dando seguimiento a las plantas y animales transgénicos como sistemas de producción potencialmente de mayor capacidad y más baratos (Chadd y otros, 2001, Curr Opin Biotechnol 12:188-194). Tales sistemas de expresión, sin embargo, pueden generar patrones de glicosilación significativamente diferentes de las glicoproteínas humanas. Esto puede resultar en la reducción o incluso la falta de una función efectora porque, como se discutió anteriormente, la estructura de los carbohidratos puede afectar significativamente la unión a FcγR y al complemento. Un problema potencialmente mayor con las glicofomas no humanas puede ser la inmunogenicidad; los carbohidratos son una fuente clave de antigenicidad para el sistema inmunológico, y la presencia de glicofomas no humanas tiene una posibilidad significativa de producir anticuerpos que neutralicen el agente terapéutico, o peor de causar reacciones inmunes adversas. Así, la eficacia y seguridad de los anticuerpos producidos mediante plantas y animales transgénicos siguen siendo inciertas. La expresión bacteriana es otra solución atractiva para el problema de la producción de anticuerpos. La expresión en bacterias, por ejemplo en *E. coli*, proporciona un método rentable y de alta capacidad para producir proteínas. Para proteínas complejas tales como anticuerpos existe un número de obstáculos para la expresión bacteriana, que incluyen el plegamiento y ensamblaje de estas moléculas complejas, la adecuada formación de enlaces disulfuro, y la solubilidad, la estabilidad, y la funcionalidad en ausencia de glicosilación porque las proteínas expresadas en bacterias no están glicosiladas. En *E. coli* se han expresado con éxito anticuerpos no glicosilados en toda su extensión que se unen al antígeno (Simmons y otros, 2002, J Immunol Methods 263:133-147), y por lo tanto, es posible el plegado, el ensamblaje, y la adecuada formación de enlaces disulfuros de anticuerpos expresados en bacterias en ausencia de la maquinaria de chaperonas de eucariotas. Sin embargo, la utilidad final de los anticuerpos expresados en bacterias como agentes terapéuticos permanece obstaculizada por la falta de glicosilación, lo que resulta en una falta de la función efectora y puede resultar en una pobre estabilidad y solubilidad. Esto probablemente será más problemático para la formulación a las concentraciones altas para los prolongados períodos demandados por el uso clínico.

En resumen, existe una necesidad de anticuerpos con mejores propiedades terapéuticas.

Breve descripción de la invención

5 La presente invención proporciona un polipéptido para usar en un método de tratamiento que comprende poner en contacto células efectoras que expresan FcγRIIb con dicho polipéptido, en donde dicho polipéptido se une con mayor afinidad al receptor FcγRIIb que un polipéptido parental y aumenta la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb, y en donde dicho polipéptido comprende una variante Fc de dicho polipéptido Fc parental y en donde dicha variante Fc comprende una sustitución de aminoácido S267E en comparación con dicho polipéptido Fc parental, en el que dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.

10 La presente invención proporciona además un polipéptido para usar en un método de tratamiento que comprende poner en contacto células efectoras que expresan FcγRIIb con dicho polipéptido, en donde polipéptido se une con mayor afinidad al receptor FcγRIIb que un polipéptido parental y aumenta la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb, y en donde dicho polipéptido comprende una variante Fc de dicho polipéptido Fc parental y en donde dicha variante Fc comprende una sustitución de aminoácido S267D en comparación con dicho polipéptido Fc parental, en el que dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.

15 La presente invención proporciona además un método para aumentar la unión de un polipéptido Fc al receptor FcγRIIb, dicho método comprende sustituir en un polipéptido Fc parentalel aminoácido Ser en la posición 267 con el aminoácido Glu para proporcionar una variante Fc del polipéptido Fc parental, en el que dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.

20 The present invention proporciona además un método para aumentar la unión de un polipéptido Fc al receptor FcγRIIb, dicho método comprende sustituir en un polipéptido Fc parentalel aminoácido Ser en la posición 267 con el aminoácido Asp para proporcionar una variante Fc del polipéptido Fc parental, en el que dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.

25 La presente solicitud describe variantes de la Fc que son optimizadas para un número de propiedades terapéuticamente relevantes. Estas variantes de la Fc están contenidas generalmente dentro de una proteína variante, que comprende preferentemente un anticuerpo o una proteína de fusión Fc.

30 La presente solicitud describe nuevas posiciones Fc en las que las pueden realizarse modificaciones de aminoácidos para generar variantes de la Fc optimizadas. Dichas posiciones Fc incluyen 230, 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 273, 275, 299, 302, 313, 323, 325, 328, y 332, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU según Kabat. La presente solicitud describe cualquier modificación de aminoácido en cualquiera de dichas nuevas posiciones Fc para generar una variante Fc optimizada.

35 Es un objetivo adicional de la presente solicitud proporcionar variantes de la Fc que se caractericen en la presente descripción. Dichas variantes de Fc pueden comprender al menos una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 221, 222, 223, 224, 225, 227, 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 246, 247, 249, 255, 258, 260, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 288, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 313, 317, 318, 320, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, y 337, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU según Kabat. Preferentemente, dichas variantes de Fc pueden comprender al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en D221K, D221Y, K222E, K222Y, T223E, T223K, H224E, H224Y, T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K, P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A, P230E, P230G, P230Y, A231E, A231G, A231 K, A231 P, A231 Y, P232E, P232G, P232K, P232Y, E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L, E233M, E233N, E233Q, E233R, E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A, L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I, L234K, L234M, L234N, L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A, L235D, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N, L235P, L235Q, L235R, L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A, G236D, G236E, G236F, G236H, G236I, G236K, G236L, G236M, G236N, G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D, G237E, G237F, G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P, G237Q, G237R, G237S, G237T, G237V, G237W, G237Y, P238D, P238E, P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L, P238M, P238N, P238Q, P238R, P238S, P238T, P238V, P238W, P238Y, S239D, S239E, S239F, S239G, S239H, S239I, S239K, S239L, S239M, S239N, S239P, S239Q, S239R, S239T, S239V, S239W, S239Y, V240A, V240I, V240M, V240T, F241D, F241E, F241L, F241R, F241S, F241W, F241Y, F243E, F243H, F243L, F243Q, F243R, F243S, F243Y, P244H, P245A, K246E, K246H, K246I, K246J, K246K, K246L, K246M, K246N, K246O, K246P, K246Q, K246R, K246S, K246T, K246U, K246V, K246W, K246X, K246Y, K246Z, P247G, P247H, P247I, P247J, P247K, P247L, P247M, P247N, P247O, P247P, P247Q, P247R, P247S, P247T, P247U, P247V, P247W, P247X, P247Y, P247Z, D249H, D249I, D249J, D249K, D249L, D249M, D249N, D249O, D249P, D249Q, D249R, D249S, D249T, D249U, D249V, D249W, D249X, D249Y, D249Z, R255E, R255Y, E258H, E258I, E258J, E258K, E258L, E258M, E258N, E258O, E258P, E258Q, E258R, E258S, E258T, E258U, E258V, E258W, E258X, E258Y, E258Z, T260D, T260E, T260H, T260I, T260J, T260K, T260L, T260M, T260N, T260O, T260P, T260Q, T260R, T260S, T260T, T260U, T260V, T260W, T260X, T260Y, T260Z, V262A, V262B, V262C, V262D, V262E, V262F, V262G, V262H, V262I, V262J, V262K, V262L, V262M, V262N, V262O, V262P, V262Q, V262R, V262S, V262T, V262U, V262V, V262W, V262X, V262Y, V262Z, V263A, V263B, V263C, V263D, V263E, V263F, V263G, V263H, V263I, V263J, V263K, V263L, V263M, V263N, V263O, V263P, V263Q, V263R, V263S, V263T, V263U, V263V, V263W, V263X, V263Y, V263Z, V264A, V264B, V264C, V264D, V264E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264J, V264K, V264L, V264M, V264N, V264O, V264P, V264Q, V264R, V264S, V264T, V264U, V264V, V264W, V264X, V264Y, V264Z, D265F, D265G, D265H, D265I, D265J, D265K, D265L, D265M, D265N, D265O, D265P, D265Q, D265R, D265S, D265T, D265U, D265V, D265W, D265X, D265Y, D265Z, V266A, V266B, V266C, V266D, V266E, V266F, V266G, V266H, V266I, V266J, V266K, V266L, V266M, V266N, V266O, V266P, V266Q, V266R, V266S, V266T, V266U, V266V, V266W, V266X, V266Y, V266Z, S267D, S267E, S267F, S267G, S267H, S267I, S267J, S267K, S267L, S267M, S267N, S267O, S267P, S267Q, S267R, S267T, S267U, S267V, S267W, S267X, S267Y, S267Z, H268D, H268E, H268F, H268G, H268I, H268J, H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R, H268S, H268T, H268U, H268V, H268W, H268X, H268Y, H268Z.

ES 2 530 340 T3

5 H268Q, H268R, H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H, E269I, E269K, E269L, E269M, E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y, D270F, D270G, D270H, D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R, D270S, D270T, D270W, D270Y, P271A, P271 D, P271E, P271F, P271G, P271H, P271I, P271K, P271 L, P271 M, P271 N, P271Q, P271 R, P271 S, P271T, P271V, P271W, P271Y, E272D, E272F, E272G, E272H, E272I, E272K, E272L, E272M, E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W, E272Y, V2731, K274D, K274E, K274F, K274G, K274H, K274I, K274L, K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V, K274W, K274Y, F275L, F275W, N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M, N276P, N276R, N276S, N276T, N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E, Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L, Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q, Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, D280G, D280K, D280L, D280P, D280W, G281 D, G281 E, G281 K, G281 N, G281 P, G281Q, G281Y, V282E, V282G, V282K, V282P, V282Y, E283G, E283H, E283K, E283L, E283P, E283R, E283Y, V284D, V284E, V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y, H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y, N286E, N286G, N286P, N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, K290W, P291 D, P291 E, P291 G, P291 H, P291I, P291 Q, P291T, R292D, R292E, R292T, R292Y, E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M, E293N, E293P, E293R, E293T, E293V, E293W, E293Y, E294F, E294G, E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S, E294T, E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I, Q295M, Q295N, Q295P, Q295R, Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y, Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296H, Y296I, Y296K, Y296L, Y296M, Y296N, Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297E, N297F, N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R, N297S, N297T, N297V, N297W, N297Y, S298D, S298E, S298F, S298H, S298I, S298K, S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y, T299A, T299D, T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K, T299L, T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y, Y300A, Y300D, Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P, Y300Q, Y300R, Y300S, Y300T, Y300V, Y300W, R301 D, R301 E, R301 H, R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L, S304N, S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L, E318Q, E318R, E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L, K320N, K320P, K320S, K320T, K320V, K320W, K320Y, K322D, K322F, K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T, K322V, K322W, K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324L, S324M, S324P, S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F, N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P, N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P, K326T, A327D, A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M, A327N, A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D, L328E, L328F, L328G, L328H, L328I, L328K, L328M, L328N, L328P, L328Q, L328R, L328S, L328T, L328V, L328W, L328Y, P329D, P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S, P329T, P329V, P329W, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, P331 D, P331F, P331H, P331I, P331L, P331 M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334L, K334P, K334T, T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H, and S337N, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU según Kabat. Este conjunto de variantes a veces se denomina como "el conjunto de variantes únicas".

40 Es un aspecto adicional de la solicitud proporcionar variantes de la Fc (y proteínas que contienen estas variantes) que tienen al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 o más sustituciones de aminoácidos en comparación con el polipéptido Fc parental, por ejemplo la región Fc de sec. con núm. de ident.:X. En algunas modalidades, 1, 2, 3 y 4 sustituciones encuentran un uso particular.

45 Es un aspecto adicional de la solicitud proporcionar variantes de la Fc (y proteínas que contienen estas variantes) que exhiben una unión alterada al ligando de la Fc en comparación con el polipéptido Fc parental, por ejemplo la región Fc de sec. con núm. de ident.:X, y que están codificadas por ácidos nucleicos que hibridan en condiciones de alta rigurosidad a un gen que codifica un polipéptido de Fc humano. Las condiciones de alta rigurosidad se conocen en la técnica; ver por ejemplo patente de los Estados Unidos núm. 6,875,846 particularmente para condiciones de alta rigurosidad. Los genes que codifican polipéptidos de Fc humanos son usualmente fragmentos de genes más grandes, y también se conocen en la técnica, así como genes que, debido a la degeneración del código genético codificarán un polipéptido Fc de origen natural incluso si no son de origen natural ellos mismos.

55 Es un aspecto adicional de la solicitud proporcionar polipéptidos variantes de la Fc que exhiben una actividad alterada de la ADCC, particularmente un aumento de la actividad de la ADCC. En algunos aspectos, estas variantes comprenden una sustitución de aminoácido en la posición 239, opcionalmente sustituciones de aminoácidos en las posiciones 239 y 332, y opcionalmente pueden incluir cualquier otra de las sustituciones descritas en el anterior conjunto de variantes únicas, para crear variantes que comprenden sustituciones múltiples.

60 Es un objeto adicional de la presente solicitud proporcionar las variantes de Fc que han sido caracterizadas en esta, en donde dichas variantes de la Fc se seleccionan del grupo que consiste en D221 K, D221Y, K222E, K222Y, T223E, T223K, H224E, H224Y, T225E, T225K, T225W, P227E, P227G, P227K, P227Y, P228E, P228G, P228K, P228Y, P230A, P230A/E233D, P230A/E233D/I332E, P230E, P230G, P230Y, A231 E, A231 G, A231 K, A231 P, A231 Y, P232E, P232G, P232K, P232Y, E233A, E233D, E233F, E233G, E233H, E233I, E233K, E233L, E233M, E233N, E233Q, E233R,

ES 2 530 340 T3

E233S, E233T, E233V, E233W, E233Y, L234A, L234D, L234E, L234F, L234G, L234H, L234I, L234I/L235D, L234K,
 L234M, L234N, L234P, L234Q, L234R, L234S, L234T, L234V, L234W, L234Y, L235A, L235D,
 L235D/S239D/A330Y/I332E, L235D/S239D/N297D/I332E, L235E, L235F, L235G, L235H, L235I, L235K, L235M, L235N,
 L235P, L235Q, L235R, L235S, L235T, L235V, L235W, L235Y, G236A, G236D, G236E, G236F, G236H, G236I, G236K,
 5 G236L, G236M, G236N, G236P, G236Q, G236R, G236S, G236T, G236V, G236W, G236Y, G237D, G237E, G237F,
 G237H, G237I, G237K, G237L, G237M, G237N, G237P, G237Q, G237R, G237S, G237T, G237V, G237W, G237Y,
 P238D, P238E, P238F, P238G, P238H, P238I, P238K, P238L, P238M, P238N, P238Q, P238R, P238S, P238T, P238V,
 P238W, P238Y, S239D, S239D/A330L/I332E, S239D/A330Y/I332E/L234I, S239D/A330Y/I332E/V266I,
 S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E,
 10 S239D/D265T/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/E272I/A330L/I332E, S239D/E272I/I332E,
 S239D/E272K/A330L/I332E, S239D/E272K/I332E, S239D/E272S/A330L/I332E, S239D/E272S/I332E,
 S239D/E272Y/A330L/I332E, S239D/E272Y/I332E, S239D/F241S/F243H/V262T/V264T/N297D/A330Y/I332E,
 S239D/H268D, S239D/H268E, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332E/A327D, S239D/I332E/A330I,
 S239D/I332E/A330Y, S239D/I332E/E272H, S239D/I332E/E272R, S239D/I332E/E283H, S239D/I332E/E283L,
 15 S239D/I332E/G236A, S239D/I332E/G236S, S239D/I332E/H268D, S239D/I332E/H268E, S239D/I332E/K246H,
 S239D/I332E/R255Y, S239D/I332E/S267E, S239D/I332E/V264I, S239D/I332E/V264I/A330L,
 S239D/I332E/V264I/S298A, S239D/I332E/V284D, S239D/I332E/V284E, S239D/I332E/V284E, S239D/I332N,
 S239D/I332Q, S239D/K274E/A330L/I332E, S239D/K274E/I332E, S239D/K326E/A330L/I332E,
 S239D/K326E/A330Y/I332E, S239D/K326E/I332E, S239D/K326T/A330Y/I332E, S239D/K326T/I332E,
 20 S239D/N297D/A330Y/I332E, S239D/N297D/I332E, S239D/N297D/K326E/I332E, S239D/S267E/A330L/I332E,
 S239D/S267E/I332E, S239D/S298A/K326E/I332E, S239D/S298A/K326T/I332E, S239D/V240I/A330Y/I332E,
 S239D/V264T/A330Y/I332E, S239D/Y278T/A330L/I332E, S239D/Y278T/I332E, S239E, S239E/D265G, S239E/D265N,
 S239E/D265Q, S239E/I332D, S239E/I332E, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239E/N297D/I332E,
 S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/I332E, S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E, S239F, S239G, S239H, S239I,
 25 S239K, S239L, S239M, S239N, S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332E/A330L, S239N/I332E/A330Y, S239N/I332N,
 S239N/I332Q, S239P, S239Q, S239Q/I332D, S239Q/I332E, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, S239Q/V264I/I332E, S239R,
 S239T, S239V, S239W, S239Y, V240A, V240I, V240I/V266I, V240M, V240T, F241 D, F241 E,
 F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E,
 F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R, F241L,
 30 F241L/F243L/V262I/V264I, F241L/V262I, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241W,
 F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241Y, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E,
 F241Y/F243Y/V262T/V264T, F243E, F243L, F243L/V262I/V264W, F243L/V264I, F243W, P244H, P244H/P245A/P247V,
 P245A, K246D, K246E, K246H, K246Y, P247G, P247V, D249H, D249Q, D249Y, R255E, R255Y, E258H, E258S,
 E258Y, T260D, T260E, T260H, T260Y, V262E, V262F, V263A, V263I, V263M, V263T, V264A, V264D, V264E, V264K,
 35 V264E/N297D/I332E, V264F, V264G, V264H, V264I, V264I/A330L/I332E, V264I/A330Y/I332E, V264I/I332E, V264K,
 V264L, V264M, V264N, V264P, V264Q, V264R, V264S, V264T, V264W, V264Y, D265F, D265F/N297E/I332E, D265G,
 D265H, D265I, D265K, D265L, D265M, D265N, D265P, D265Q, D265R, D265S, D265T, D265V, D265W, D265Y,
 D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332E, V266A, V266I, V266M, V266T, S267D, S267E, S267E,
 S267E/A327D, S267E/P331D, S267E/S324I, S267E/V282G, S267F, S267H, S267I, S267K, S267L, S267L/A327S,
 40 S267M, S267N, S267P, S267Q, S267Q/A327S, S267R, S267T, S267V, S267W, S267Y, H268D, H268E, H268F,
 H268G, H268I, H268K, H268L, H268M, H268P, H268Q, H268R, H268T, H268V, H268W, E269F, E269G, E269H,
 E269I, E269K, E269L, E269M, E269N, E269P, E269R, E269S, E269T, E269V, E269W, E269Y, D270F, D270G, D270H,
 D270I, D270L, D270M, D270P, D270Q, D270R, D270S, D270T, D270W, D270Y, P271A, P271 D, P271E, P271F,
 P271G, P271H, P271I, P271K, P271L, P271M, P271N, P271Q, P271R, P271S, P271T, P271V, P271W, P271Y, E272D,
 45 E272F, E272G, E272H, E272I, E272K, E272L, E272M, E272P, E272R, E272S, E272T, E272V, E272W, E272Y, V273I,
 K274D, K274E, K274F, K274G, K274H, K274I, K274L, K274M, K274N, K274P, K274R, K274T, K274V, K274W, K274Y,
 F275L, F275W, N276D, N276E, N276F, N276G, N276H, N276I, N276L, N276M, N276P, N276R, N276S, N276T,
 N276V, N276W, N276Y, Y278D, Y278E, Y278G, Y278H, Y278I, Y278K, Y278L, Y278M, Y278N, Y278P, Y278Q,
 Y278R, Y278S, Y278T, Y278V, Y278W, Y278W, Y278W/E283R/V302I, Y278W/V302I, D280G, D280K, D280L, D280P,
 50 D280W, G281D, G281D/V282G, G281E, G281K, G281 N, G281 P, G281 Q, G281Y, V282E, V282G, V282G/P331 D,
 V282K, V282P, V282Y, E283G, E283H, E283K, E283L, E283P, E283R, E283R/V302I/Y278W/E283R, E283Y, V284D,
 V284E, V284L, V284N, V284Q, V284T, V284Y, H285D, H285E, H285K, H285Q, H285W, H285Y, N286E, N286G,
 N286P, N286Y, K288D, K288E, K288Y, K290D, K290H, K290L, K290N, K290W, P291D, P291E, P291G, P291H, P291I,
 P291Q, P291T, R292D, R292E, R292T, R292Y, E293F, E293G, E293H, E293I, E293L, E293M, E293N, E293P, E293R,
 55 E293S, E293T, E293V, E293W, E293Y, E294F, E294G, E294H, E294I, E294K, E294L, E294M, E294P, E294R, E294S,
 E294T, E294V, E294W, E294Y, Q295D, Q295E, Q295F, Q295G, Q295H, Q295I, Q295M, Q295N, Q295P, Q295R,
 Q295S, Q295T, Q295V, Q295W, Q295Y, Y296A, Y296D, Y296E, Y296G, Y296I, Y296K, Y296L, Y296M, Y296N,
 Y296Q, Y296R, Y296S, Y296T, Y296V, N297D, N297D/I332E, N297D/I332E/A330Y, N297D/I332E/S239D/A330L,
 N297D/I332E/S239D/D265V, N297D/I332E/S298A/A330Y, N297D/I332E/T299E, N297D/I332E/T299F,
 60 N297D/I332E/T299H, N297D/I332E/T299I, N297D/I332E/T299L, N297D/I332E/T299V, N297D/I332E/Y296D,
 N297D/I332E/Y296E, N297D/I332E/Y296H, N297D/I332E/Y296N, N297D/I332E/Y296Q, N297D/I332E/Y296T,
 N297E/I332E, N297F, N297G, N297H, N297I, N297K, N297L, N297M, N297P, N297Q, N297R, N297S, N297S/I332E,
 N297T, N297V, N297W, N297Y, S298A/I332E, S298A/K326E, S298A/K326E/K334L, S298A/K334L, S298D, S298E,

ES 2 530 340 T3

5 S298F, S298H, S298I, S298K, S298M, S298N, S298Q, S298R, S298T, S298W, S298Y, T299A, T299D, T299E, T299F, T299G, T299H, T299I, T299K, T299L, T299M, T299N, T299P, T299Q, T299R, T299S, T299V, T299W, T299Y, Y300A, Y300D, Y300E, Y300G, Y300H, Y300K, Y300M, Y300N, Y300P, Y300Q, Y300R, Y300S, Y300T, Y300V, Y300W, R301D, R301 E, R301 H, R301Y, V302I, V303D, V303E, V303Y, S304D, S304H, S304L, S304N, S304T, V305E, V305T, V305Y, W313F, K317E, K317Q, E318H, E318L, E318Q, E318R, E318Y, K320D, K320F, K320G, K320H, K320I, K320L, K320N, K320P, K320S, K320T, K320V, K320W, K320Y, K322D, K322F, K322G, K322H, K322I, K322P, K322S, K322T, K322V, K322W, K322Y, V323I, S324D, S324F, S324G, S324H, S324I, S324I/A327D, S324L, S324M, S324P, S324R, S324T, S324V, S324W, S324Y, N325A, N325D, N325E, N325F, N325G, N325H, N325I, N325K, N325L, N325M, N325P, N325Q, N325R, N325S, N325T, N325V, N325W, N325Y, K326I, K326L, K326P, K326T, A327D, 10 A327E, A327F, A327H, A327I, A327K, A327L, A327M, A327N, A327P, A327R, A327S, A327T, A327V, A327W, A327Y, L328A, L328D, L328D/I332E, L328E, L328E/I332E, L328F, L328G, L328H, L328H/I332E, L328I, L328I/I332E, L328I/I332E, L328K, L328M, L328M/I332E, L328N, L328N/I332E, L328P, L328Q, L328Q/I332E, L328Q/I332E, L328R, L328S, L328T, L328T/I332E, L328V, L328V/I332E, L328W, L328Y, P329D, P329E, P329F, P329G, P329H, P329I, P329K, P329L, P329M, P329N, P329Q, P329R, P329S, P329T, P329V, P329V, P329Y, A330E, A330F, A330G, A330H, A330I, A330L, A330L/I332E, A330M, A330N, A330P, A330R, A330S, A330T, A330V, A330W, A330Y, 15 A330Y/I332E, P331 D, P331 F, P331 H, P331I, P331L, P331 M, P331Q, P331R, P331T, P331V, P331W, P331Y, I332A, I332D, I332E, I332E/G281D, I332E/H268D, I332E/H268E, I332E/S239D/S298A, I332E/S239N/S298A, I332E/V264I/S298A, I332E/V284E, I332F, I332H, I332K, I332L, I332M, I332N, I332P, I332Q, I332R, I332S, I332T, I332V, I332W, I332Y, E333F, E333H, E333I, E333L, E333M, E333P, E333T, E333Y, K334F, K334I, K334P, K334T, 20 T335D, T335F, T335G, T335H, T335I, T335L, T335M, T335N, T335P, T335R, T335S, T335V, T335W, T335Y, I336E, I336K, I336Y, S337E, S337H, and S337N, en donde la numeración de los residuos en la región Fc es aquella del índice EU según Kabat.

25 Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar una variante Fc que se une con mayor afinidad a uno o más Fc γ R_s. Dichas variantes de Fc pueden tener afinidad por un Fc γ R que es más de 1 vez mayor que la del polipéptido Fc parental. Dichas variantes de Fc pueden tener afinidad por un Fc γ R que es más de 5 vez mayor que la del polipéptido Fc parental. Dichas variantes de Fc pueden tener afinidad por un Fc γ R que es entre aproximadamente 5 veces y 300 veces mayor que la del polipéptido Fc parental.

30 Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar una variante Fc que tiene una relación de veces de Fc γ RIIIa: veces de Fc γ RIIIb mayor que 1:1. Dichas variantes de la Fc pueden tener una relación de veces de Fc γ RIIIa: veces de Fc γ RIIIb mayor que 11:1. Dichas variantes de la Fc pueden tener relación de veces de Fc γ RIIIa: veces de Fc γ RIIIb entre 11:1 y 86:1.

35 Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar variantes de la Fc que median la función efectora de manera más eficaz en presencia de células efectoras. Dichas variantes de la Fc pueden mediar la ADCC que es mayor que la mediada por el polipéptido Fc parental. Dichas variantes de la Fc pueden mediar la ADCC que es más de 5 veces mayor que la mediada por el polipéptido Fc parental. Dichas variantes de la Fc pueden mediar la ADCC que es entre 5 veces y 1000 veces mayor que la mediada por el polipéptido Fc parental.

40 Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar variantes de la Fc que se unen con una afinidad más débil a uno o más Fc γ R. Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar variantes de la Fc que median la ADCC en presencia de células efectoras menos eficazmente.

45 Es un objetivo adicional de la presente solicitud proporcionar variantes de la Fc que tienen mejor función y/o propiedades de la solución en comparación con la forma no glicosilada del polipéptido Fc parental. Una funcionalidad mejorada en la presente incluye pero no se limita a la afinidad de unión a un ligando de Fc. Las propiedades mejoradas de la solución en la presente incluyen pero no se limitan a la estabilidad y la solubilidad. En una modalidad, dichas variantes de la Fc se unen a un Fc γ R con una afinidad que es dentro de aproximadamente 0.5 veces de la forma glicosilada del polipéptido Fc parental. En una modalidad alternativa, dichas variantes de la Fc no glicosiladas se unen a un Fc γ R con una afinidad que es comparable con el polipéptido Fc parental glicosilado. En una modalidad alternativa, dichas variantes de la Fc se unen a un Fc γ R con una afinidad que es mayor que la forma glicosilada del polipéptido Fc parental.

55 La presente solicitud proporciona, además, métodos para modificar variantes optimizadas de la Fc. Es otro objetivo de la presente solicitud proporcionar una producción experimental y métodos de tamizaje para obtener variantes optimizadas de la Fc.

60 La presente solicitud proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican las variantes de la Fc descritas en la presente. La presente solicitud proporciona vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. La presente solicitud proporciona células huéspedes que contienen los vectores, y métodos para producir y, opcionalmente, recuperar las variantes de la Fc.

La presente solicitud proporciona nuevos polipéptidos Fc, que incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aisladas, y fragmentos de Fc, que comprenden las variantes de la Fc descritas en la presente. Dichos polipéptidos Fc novedosos pueden encontrar uso en un producto terapéutico.

La presente solicitud proporciona composiciones que comprenden polipéptidos Fc que componen las variantes de Fc descritas en la presente, y un vehículo o diluyente aceptable fisiológicamente o farmacéuticamente.

La presente solicitud contempla usos terapéuticos y de diagnóstico para polipéptidos Fc que comprenden las variantes de Fc descritas en la presente.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura y función del anticuerpo. Se muestra un modelo de un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa, modelado usando una estructura Fab humanizada a partir del código de acceso a pdb 1CE1 (James y otros, 1999, J Mol Biol 289:293-301) y una estructura Fc de IgG1 humana a partir de código de acceso a pdb 1 DN2 (DeLano y otros, 2000, Science 287:1279-1283). No se muestra la región bisagra flexible que une las regiones Fab y Fc. La IgG1 es un homodímero de heterodímeros, compuesta por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Los dominios Ig que comprenden el anticuerpo están identificados, e incluyen V_L y C_L para la cadena ligera y V_H , $C_{\gamma 1}$ (Cy1), $C_{\gamma 2}$ (Cy2), y $C_{\gamma 3}$ (Cy3) para la cadena pesada. La región Fc está identificada. Los sitios de unión para proteínas relevantes están identificados, los que incluyen el sitio de unión al antígeno en la región variable, y los sitios de unión para Fc γ R, FcRn, C1q, y las proteínas A y G en la región Fc.

Figura 2. La estructura del complejo Fc/Fc γ RIIIb 1IIS. La Fc se muestra como un diagrama de cinta gris, y Fc γ RIIIb se muestra como una cinta negra. El carbohidrato N297 se muestra como barras negras.

Figuras 3a - 3b. Alineación de las secuencias de aminoácidos de las inmunoglobulinas IgG humanas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. La Figura 3a proporciona las secuencias de los dominios CH1 (Cy1) y la región bisagra, y la

Figura 3b proporciona las secuencias de los dominios CH2 (Cy2) y CH3 (Cy3). Las posiciones se numeran de acuerdo con el índice EU de la secuencia de IgG1, y las diferencias entre IgG1 y las otras inmunoglobulinas IgG2, IgG3, e IgG4 se muestran en gris. Existen polimorfismos en un número de posiciones (Kim y otros, 2001, J. Mol. Evol. 54:1-9), y por lo tanto pueden existir pequeñas diferencias entre las secuencias presentadas y las secuencias en el estado de la técnica. Los posibles inicios de la región Fc están identificados, definidos en la presente ya sea como la posición EU 226 o 230.

Figura 4. Residuos en los que se realizaron modificaciones de aminoácidos en las variantes de Fc de la presente invención, mapeados sobre la estructura del complejo Fc/Fc γ RIIIb 1IIS. La Fc se muestra como un diagrama de cinta gris, y Fc γ RIIIb se muestra como una cinta negra. Los residuos de la biblioteca experimental se muestran en negro, el carbohidrato N297 se muestra en gris.

Figura 5. Expresión de proteínas de alemtuzumab con variantes de Fc y de tipo silvestre (WT) en células 293T. Los plásmidos que contienen los genes de la cadena pesada de alemtuzumab (WT o las variantes) se co-transfectaron con el plásmido que contiene el gen de la cadena ligera de alemtuzumab. Los medios se recolectaron 5 días después de la transfección. Para cada muestra transfectada, se cargaron 10 μ l de medio en un gel de SDS-PAGE para análisis por Western. La sonda para el Western fue un anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno-Research, Catálogo núm. 109-035-088). WT: alemtuzumab silvestre; 1-10: variantes de alemtuzumab. H y L indican cadena pesada y cadena ligera de anticuerpo, respectivamente.

Figura 6. Purificación de alemtuzumab usando cromatografía de proteína A. Las proteínas alemtuzumab de tipo silvestre se expresaron en células 293T y los medios se recolectaron 5 días después de la transfección. Los medios se diluyeron 1:1 con PBS y se purificaron con la proteína A (Pierce, Catálogo núm. 20334). O: muestra original antes de la purificación; FT: flujo pasante; E: elución; C: muestra concentrada final. La imagen de la izquierda muestra un gel SDS-PAGE teñido con Azul Simple, y la derecha muestra una membrana de Western marcada mediante el uso de un anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado con peroxidasa.

Figura 7. Producción de anticuerpos desglucosilados. El tipo salvaje y variantes de alemtuzumab se expresaron en células 293T y se purificaron con cromatografía de la proteína A. Los anticuerpos se incubaron con péptido-N-glicosidasa (PNGasa F) a 37°C por 24h. Para cada anticuerpo, se realizó en paralelo una muestra tratada de manera simulada (-PNGasa F). WT: alemtuzumab silvestre; #15, #16, #17, #18, #22: variantes de alemtuzumab F241 E/F243RN262EN264R, F241 E/F243QN262TN264E, F241 R/F243Q/V262T/V264R, F241

E/F243Y/V262T/V264R, e I332E respectivamente. La migración más rápida de las muestras tratadas con PNGasa F en comparación con las tratadas de manera simulada representa las cadenas pesadas desglucosiladas.

5 Figura 8. El alemtuzumab expresado en células 293T se une a su antígeno. El péptido antigénico CD52, fusionado a GST, se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) bajo inducción con IPTG. Ambas muestras no inducida e inducida se corrieron en un gel SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para el análisis Western, se usó ya sea alemtuzumab de Sotec (a-CD52, Sotec) (concentración final 2.5 ng/ul) o medios de células 293T transfectadas (Campath, Xencor) (concentración final de alemtuzumab aproximadamente 0.1-0.2ng/ul) como anticuerpo primario, y se usó anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. M: marcador de pre-tinción; U: muestra no inducida por GST-CD52; I: muestra inducida por GST-CD52.

15 Figura 9. Expresión y purificación de la región extracelular de FcγRIIIa V158 humano. FcγRIIIa etiquetado se transfectó en células 293T, y los medios que contenían FcγRIIIa secretado se recolectaron 3 días más tarde y se purificaron mediante el uso de cromatografía de afinidad. 1: medios; 2: flujo pasante; 3: lavado; 4-8: eluciones en serie. Se muestra tanto el resultado del gel SDS-PAGE teñido con azul simple como del western. Para la membrana de Western, la membrana se sondeó con un anticuerpo anti-GST.

20 Figura 10. Unión a FcγRIIIa V158 humano por variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas de la biblioteca experimental como se determina por el ensayo AlphaScreen™, descrito en el Ejemplo 2. En presencia del anticuerpo competidor (alemtuzumab con variantes de Fc o de tipo silvestre) se observa una curva de inhibición característica como una disminución en la señal de luminiscencia. La solución salina regulada con fosfato (PBS) sola se usó como control negativo. Los datos de unión se normalizaron con respecto a la señal de luminiscencia máxima y mínima para cada curva particular, proporcionadas por las líneas de referencia a las concentraciones de anticuerpos bajas y altas, respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio mediante el uso de una regresión no lineal. Estos ajustes proporcionan las IC50 para cada anticuerpo, ilustrado para WT y S239D por las líneas punteadas.

30 Figuras 11a y 11b. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes seleccionadas de Fc de alemtuzumab (Figura 11a) y trastuzumab (Figura 11b) al FcγRIIIa Val158 humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

35 Figuras 12. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes seleccionadas de Fc de alemtuzumab al FcγRIIb humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

40 Figuras 13. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes seleccionadas de Fc de alemtuzumab al FcγRIIIa R131 humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio.

45 Figura 14. Ensayo AlphaScreen que mide la unión de variantes seleccionadas de la Fc de alemtuzumab al FcRn humano, como se describe en el Ejemplo 2. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

50 Figura 15. Ensayo AlphaScreen que mide la unión de variantes seleccionadas de la Fc de alemtuzumab a la proteína A bacteriana, como se describe en el Ejemplo 2. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

55 Figuras 16a - 16b. Ensayo AlphaScreen que compara la unión de variantes seleccionadas de la Fc de alemtuzumab al FcγRIIIa V158 humano (Figura 16a) y FcγRIIb humano (Figura 16b). Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

60 Figuras 17a - 17b. Ensayo AlphaScreen que mide la unión al FcγRIIIa V158 humano (Figuras 17a y 17b) y FcγRIIb humano (Figura 17c) por variantes de la Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab. Los datos de

unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

5 Figura 18. Ensayo AlphaScreen para medir la unión al FcγRIIIa V158 humano por variantes de la Fc seleccionadas en el contexto de rituximab. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

10 Figura 19. Ensayo AlphaScreen para medir la unión al FcγRIIIa V158 humano por variantes de la Fc seleccionadas en el contexto de cetuximab. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

15 Figuras 20a - 20b. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes de la Fc seleccionadas de alemtuzumab a los alotipos V158 (Figura 20a) y F158 (Figura 20b) del FcγRIIIa humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

20 Figuras 21a - 21 d. Las Figuras 21a y 21b muestran la correlación entre las Kd de SPR y las IC50 de AlphaScreen a partir de la unión de variantes seleccionadas de la Fc de alemtuzumab al FcγRIIIa V158 (Figura 21a) y FcγRIIIa F158 (Figura 21b). Las Figuras 21c y 21d muestran la correlación entre las veces de mejora por SPR y AlphaScreen sobre el tipo silvestre para la unión de las variantes de Fc seleccionadas de alemtuzumab al FcγRIIIa V158 (Figura 21 c) y FcγRIIIa F158 (Figura 21 d). Los datos de unión se presentan en la Tabla 3. Las líneas a través de los datos representan los ajustes lineales de los datos, y los valores r^2 indican la significación de estos ajustes.

25 Figuras 22a y 22b. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas al FcγRIIIa V158 humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

30 Figuras 23a - 23b. Ensayos de ADCC basada en células de las variantes de Fc seleccionadas en el contexto de alemtuzumab. La ADCC se midió mediante el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA), como se describe en el Ejemplo 3, mediante el uso de células objetivos de linfoma DoHH-2 y PBMC humanos en un exceso de 50 veces. La Figura 23a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia en bruto para los anticuerpos de alemtuzumab indicados a 10 ng/ml. La barra de PBMC indica niveles basales de citotoxicidad en la ausencia de anticuerpo. La Figura 23b muestra la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de alemtuzumab indicados, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionada por las líneas de referencia a las concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.

35 Figuras 24a - 24c. Ensayos de ADCC basada en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab. La ADCC se midió mediante el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA®, como se describe en el Ejemplo 3, mediante el uso de células objetivos de carcinoma de mama BT474 y Sk-Br-3 y PBMC humanos en un exceso de 50 veces. La Figura 24a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia en bruto para los anticuerpos de trastuzumab indicados a 1 ng/ml. La barra de PBMC indica los niveles basales de citotoxicidad en la ausencia de anticuerpo. Las Figuras 24b y 24c muestran la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de trastuzumab indicados, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionada por las líneas de referencia a las concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.

40 Figuras 25a - 25c. Ensayos de ADCC basada en células de las variantes de Fc seleccionadas en el contexto de rituximab. La ADCC se midió mediante el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA®, como se describe en el Ejemplo 3, mediante el uso de células objetivos de linfoma WIL2-S y PBMC humanos en un exceso de 50 veces. La Figura 25a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia en bruto para los anticuerpos de rituximab indicados a 1 ng/ml. La barra de PBMC indica niveles basales de citotoxicidad en la ausencia de anticuerpo. Las Figuras 25b y 25c muestran la dependencia de la dosis de la

ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de rituximab indicados, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionadas por las líneas de referencia a concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.

5

Figuras 26a - 26b. El ensayo de la ADCC basada en células de las variantes de Fc seleccionadas de trastuzumab (Figura 26a) y rituximab (Figura 26b) que muestran mejoras en potencia y eficacia. Ambos ensayos usaron PBMC con FcγRIIIa F158/F158 homocigotos como células efectoras en un exceso de 25 veces con respecto a las células objetivos, que fueron Sk-Br-3 para el ensayo de trastuzumab y WIL2-S para el ensayo de rituximab. Los datos se normalizaron de acuerdo con la lisis mínima absoluta para el ensayo, proporcionada por la señal de fluorescencia de las células objetivos en presencia de PBMC solos (sin anticuerpo), y la lisis máxima absoluta para el ensayo, proporcionada por la señal de fluorescencia de las células objetivos en presencia de Triton X1000, como se describe en el Ejemplo 3.

10

15

Figura 27. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes de Fc seleccionadas de alemtuzumab al FcγRIIIa V158 humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.

20

Figura 28. ADCC. Ensayos de la ADCC basada en células de anticuerpos trastuzumab con variantes de Fc seleccionadas en comparación con trastuzumab de tipo silvestre. Los monocitos de sangre humana periférica (PBMC) purificados se usaron como células efectoras, y las células de carcinoma de mama Sk-Br-3 se usaron como células objetivos. La lisis se monitoreó mediante la medición de la actividad de LDH con el uso del kit de Detección de Citotoxicidad (LDH, Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Las muestras se analizaron por triplicado para proporcionar estimaciones de error (n=3, +/- S.D.). La Figura muestra la dependencia de la dosis de la ADCC a varias concentraciones de anticuerpo, normalizada con respecto a los niveles mínimo y máximo de lisis para el ensayo. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.

25

30

Figuras 29a - 29b. Ensayo de la ADCC basada en células de variantes de Fc seleccionadas de trastuzumab contra diferentes líneas celulares que expresan niveles variables del antígeno objetivo Her2/neu. Los ensayos de ADCC se corrieron como se describe en el Ejemplo 5, con varias líneas celulares que expresan niveles de amplificados a bajos del receptor Her2/neu, que incluyen Sk-Br-3 (1x10⁶ copias), SkOV3 (~1x10⁵), OVCAR3 (~1x10⁴), y MCF-7 (~3x10³ copias). La Figura 29a proporciona una membrana de western que muestra el nivel de expresión de Her2 para cada línea celular; se cargaron cantidades equivalentes de lisado celular en un gel SDS-PAGE, y Her2 se detectó mediante el uso de trastuzumab. Se usaron PBMC humanos alotipados como FcγRIIIa F158/F158 homocigotos en un exceso de 25 veces con respecto a las células objetivos. El gráfico de barras en la Figura 29b proporciona datos de ADCC para el tipo silvestre y variantes de Fc contra las líneas celulares indicadas, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionadas por la lisis mínima (PBMC solos) y la lisis máxima (Triton X1000).

35

40

Figura 30. Ensayos de ADCC basada en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab mediante el uso de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) como células efectoras y mediante la medición de la liberación de LDH para monitorear la lisis celular. Las células NK, alotipadas como FcγRIIIa F158/F158 heterocigotos, estaban en un exceso de 4 veces con respecto a las células objetivos de carcinoma de mama Sk-Br-3, y el nivel de citotoxicidad se midió mediante el uso del Kit de Detección de citotoxicidad de LDH, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania). El gráfico muestra la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de trastuzumab indicados, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionadas por las líneas de referencia a concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.

45

50

Figura 31. Ensayo de ADCP basada en células de variantes seleccionadas. El ensayo de ADCP se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 7, mediante el uso de una estrategia de co-marcaje acoplada con citometría de flujo. Se usaron macrófagos diferenciados como células efectoras, y se usaron células SK-BR-3 como células objetivos. El por ciento de fagocitosis representa el número de células co-marcadas (macrófago + Sk-Br-3) sobre el número total de Sk-Br-3 en la población (fagocitadas + no fagocitadas).

55

60

Figuras 32a - 32c. Capacidad de las variantes de Fc seleccionadas para mediar en la unión y la activación del complemento. La Figura 32a muestra un ensayo alphaScreen que mide la unión de variantes de Fc seleccionadas de alemtuzumab a C1q. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a

- 5 un modelo de competencia de un sitio. Las Figuras 32b y 31c muestran un ensayo basado en células que mide la capacidad de las variantes de Fc seleccionadas de rituximab para mediar la CDC. Los ensayos de CDC se realizaron con el uso de Azul Alamar para monitorear la lisis de células de linfoma WIL2-S opsonizadas con las variantes de Fc y el tipo silvestre de rituximab, por el complemento de suero humano (Quidel, San Diego, CA). La dependencia de la dosis sobre la concentración de anticuerpos de la lisis mediada por el complemento se muestra para los anticuerpos de rituximab indicados, normalizadas con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionadas por las líneas de referencia a concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.
- 10 Figuras 33a - 33c. Aumento de la depleción de células B por variantes de Fc en macacos, como se describe en el Ejemplo 9. La Figura 33a muestra el por ciento de células B restantes en monos *Macaca fascicularis* durante el tratamiento con anticuerpos rituximab anti-CD20 de tipo silvestre y S239D/I332E, medido con el uso de marcadores CD20+ y CD40+. La Figura 33b muestra el porcentaje de células asesinas naturales (NK) restantes en los monos durante el tratamiento, medido con el uso de marcadores CD3/CD16+ y CD3/CD8+. La Figura 33c muestra la respuesta a la dosis de los niveles de células B CD20+ al tratamiento con rituximab S239D/I332E. Los datos se presentan como el promedio de 3 monos/muestra.
- 15 Figuras 34a y 34b. Ensayo alphaScreen que mide la unión de variantes de Fc seleccionadas de alemtuzumab (Figura 34a) y trastuzumab (Figura 34b) al FcγRIII de ratón, como se describe en el Ejemplo 10. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.
- 20 Figura 35. Ensayos de ADCC basada en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab mediante el uso de PBMC de ratón como células efectoras. La ADCC se midió mediante el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® mediante el uso de células objetivos de carcinoma de mama Sk-Br-3 y PBMC de ratón en un exceso de 8 veces. El gráfico de barras muestra los datos de fluorescencia en bruto para los anticuerpos de trastuzumab indicados a 10 ng/ml. La barra de PBMC indica los niveles basales de citotoxicidad en ausencia de anticuerpo, y TX indica la lisis celular completa en presencia de Triton X1000.
- 25 Figura 36. Ensayo alphaScreen que mide la unión al FcγRIIIa V158 humano por variantes de Fc seleccionadas de trastuzumab expresadas en células 293T y CHO, como se describe en el Ejemplo 11. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.
- 30 Figuras 37a - 37b. Sinergia de variantes de la Fc y glicofomas modificadas. La Figura 37a presenta un ensayo alphaScreen que muestra al FcγRIIIa V158 que se une a trastuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc (V209, S239/I332E/A330L) expresados en células 293T, CHO, y Lec-13 CHO. Los datos se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo. La Figura 37b presenta un ensayo de ADCC basada en células que muestra la capacidad de trastuzumab de tipo silvestre y V209 expresados en 293T, CHO, y Lec-13 CHO para mediar la ADCC. La ADCC se midió con el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® como se describió anteriormente, con células objetivos de carcinoma de mama 3 Sk-Br. Los datos muestran la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de trastuzumab indicados, normalizados con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionadas por las líneas de referencia a concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideo de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal.
- 35 Figura 38. Ensayo AlphaScreen que muestra la unión de variantes no glicosiladas de Fc de alemtuzumab al FcγRIIIa V158 humano. Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio. PBS se usó como un control negativo.
- 40 Figura 39. Ensayo alphaScreen que compara la unión del FcγRIIIa V158 humano por variantes de Fc seleccionadas de alemtuzumab glicosiladas (símbolos sólidos, líneas continuas) y desglucosiladas (símbolos abiertos, líneas punteadas). Los datos de unión se normalizaron con respecto a las líneas de referencia superior e inferior para cada anticuerpo particular, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competencia de un sitio.
- 45
- 50
- 55
- 60

Figuras 40a - 40c. Secuencias que muestran anticuerpos anti-CD20 mejorados. Las secuencias de las cadenas ligera y pesada de rituximab se presentan en la Figura 40a y la Figura 40b respectivamente, y están tomadas de la Secuencia traducida 3 de US 5,736,137. Las posiciones relevantes en la Figura 40b están en negrita, incluyendo S239, V240, V264I, H268, E272, K274, N297, S298, K326, A330, y 1332. La Figura 40c muestra las secuencias mejoradas de la cadena pesada de anticuerpo anti-CD20, con las posiciones variables designadas en negrita como X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, Z1, y Z2. La tabla debajo de la secuencia proporciona sustituciones posibles para estas posiciones. Las secuencias mejoradas de anticuerpos anti-CD20 comprenden al menos un aminoácido que no es del tipo silvestre seleccionado del grupo de posibles sustituciones para X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, y X9. Estas secuencias mejoradas de anticuerpos anti-CD20 pueden comprender, además, una sustitución Z1 y/o Z2. Estas posiciones están numeradas de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y por lo tanto no se corresponden con el orden secuencial en la secuencia.

La Figura 41 representa el conjunto de variantes de Fc que se construyeron y se probaron experimentalmente.

La Figura 42 representa la sec. con núm. de ident.:5; los residuos Xaa particulares son como se muestran en la Tabla 10.

Descripción detallada de la invención

Para que la invención se entienda más completamente, se exponen más abajo varias definiciones. Tales definiciones están destinadas a abarcar equivalentes gramaticales.

Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" como se usa en la presente se entiende la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y subsecuentemente causan la lisis de la célula objetivo.

Por "ADCP" o "fagocitosis celular dependiente del anticuerpo" como se usa en la presente se entiende a la reacción mediada por células en donde las células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y subsecuentemente causan la fagocitosis de la célula objetivo.

Por "modificación de aminoácidos" en la presente se entiende una sustitución de aminoácido, una inserción y/o una delección en una secuencia de polipéptido. La modificación de aminoácido preferida en la presente descripción es una sustitución. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en la presente se entiende la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución I332E se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante Fc, en la que la isoleucina en la posición 332 se sustituye con un ácido glutámico. En algunas modalidades, la identidad de WT no necesita definirse. Por ejemplo, la sustitución 332E se refiere a un polipéptido variante en el que la posición 332 se muta a ácido glutámico.

Por "anticuerpo" en la presente se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por la totalidad o parte de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en los seres humanos, incluyen los loci genéticos kappa (κ), lambda (λ), y cadena pesada, que en conjunto comprenden los innumerables genes de la región variable, y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG, IgE, e IgA respectivamente. Los anticuerpos en la presente se entiende que incluyen los anticuerpos en toda su extensión y fragmentos de anticuerpos, y pueden referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado, o un anticuerpo generado por recombinación con propósitos experimentales, terapéuticos, u otros propósitos como se define adicionalmente más abajo. El término "anticuerpo" incluye fragmentos de anticuerpos, como se conocen en la técnica, tales como Fab, Fab', F(ab)₂, Fv, scFv, u otras subsecuencias de anticuerpos con unión al antígeno, ya sea producidos por la modificación de los anticuerpos enteros o aquellos sintetizados de novo mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante. Particularmente preferidos son los anticuerpos en toda su extensión que comprenden variantes de la Fc como se describe en la presente. El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos pueden ser antagonistas, agonistas, neutralizantes, inhibidores, o estimuladores. Los anticuerpos de la presente invención pueden no ser humanos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos, como se describe más abajo con más detalle.

Específicamente dentro de la definición de "anticuerpo" se incluyen los anticuerpos no glicosilados. Por "anticuerpo no glicosilado" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que carece de carbohidrato unido a la posición 297 de la región Fc, en donde la numeración está de acuerdo con el sistema EU como en Kabat. El anticuerpo no glicosilado puede ser un anticuerpo desglicosilado, que es un anticuerpo al que se le ha eliminado el carbohidrato de Fc, por ejemplo químicamente o enzimáticamente. Alternativamente, el anticuerpo no glicosilado puede ser un anticuerpo no glicosilado o sin glicosilar, que es un anticuerpo que se expresó sin carbohidrato en Fc, por ejemplo por mutación de uno o residuos que codifican el patrón de glicosilación o por expresión en un organismo que no adhiere carbohidratos a las proteínas, por ejemplo bacterias.

Específicamente dentro de la definición de "anticuerpo" se incluyen los anticuerpos en toda su extensión que contienen una porción variante de Fc. Por "anticuerpo en toda su extensión" en la presente se entiende a la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo a los seres humanos y los ratones, el anticuerpo en la longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consiste de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, cada par tiene una cadena ligera y una pesada, cada cadena ligera comprende los dominios de inmunoglobulina V_L y C_L , y cada cadena pesada comprende los dominios de inmunoglobulina V_H , C_{H1} , C_{H2} , y C_{H3} . En algunos mamíferos, por ejemplo en camellos y en llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir en sólo dos cadenas pesadas, cada cadena pesada comprende un dominio variable unido a la región Fc. Por "IgG" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma inmunoglobulínico reconocido. En los humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En los ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos" como se usa en la presente se entiende uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquiera de los análogos no naturales que pueden estar presentes en una posición definida, específica. Por "proteína" en la presente se entiende a al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, lo que incluye a las proteínas, los polipéptidos, los oligopéptidos y los péptidos. La proteína puede estar compuesta de aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir "análogas", tales como peptoides (ver Simon y otros, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89(20):9367) particularmente cuando los péptidos LC son para administrarse a un paciente. Así, "aminoácido", o "residuo peptídico", como se usa en la presente significan aminoácidos tanto naturales como sintéticos. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los propósitos de la invención. "Aminoácido" incluye, además, residuos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. La cadena lateral puede estar tanto en la configuración (R) como en la (S). En la modalidad preferida, los aminoácidos están en la configuración (S) o L. Si se usan cadenas laterales que no son de origen natural, pueden usarse sustituyentes no aminoacídicos, por ejemplo para evitar o retardar la degradación in vivo.

Por "función efectora" como se usa en la presente se entiende el evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen pero sin limitarse a ADCC, ADCP, y CDC. Por "célula efectora" como se usa en la presente se entiende una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero sin limitarse a los monocitos, los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas, los eosinófilos, los mastocitos, las plaquetas, las células B, los linfocitos grandes granulares, las células de Langerhans, las células asesinas naturales (NK), las células T $\gamma\gamma$, y pueden ser de cualquier organismo que incluye, pero sin limitarse a, los seres humanos, los ratones, las ratas, los conejos y los monos. Por "biblioteca" en la presente se entiende un conjunto de variantes de Fc en cualquier forma, que incluye pero sin limitarse a una lista de secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, una lista de sustituciones de ácidos nucleicos o de aminoácidos en las posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes de Fc, ya sea en forma purificada o impura.

Por "Fc" o "región Fc", como se usa en la presente se entiende al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio inmunoglobulínico de la región constante. Así Fc se refiere a los dos últimos dominios inmunoglobulínicos de la región constante de IgA, IgD e IgG y los últimos tres dominios inmunoglobulínicos de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra N-terminal flexible de esos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Por IgG, como se ilustra en la Figura 1, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 ($C_{\gamma 2}$ y $C_{\gamma 3}$) y la bisagra entre Cgamma1 ($C_{\gamma 1}$) y Cgamma2 ($C_{\gamma 2}$). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente para que comprenda los residuos C226 o P230 hacia su carboxilo-terminal, en donde la numeración es de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o a esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe a continuación. Por "polipéptido Fc" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que comprende todo o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc.

Por "fusión Fc" como se usa en la presente se entiende una proteína en donde uno o más polipéptidos o moléculas pequeñas se une operativamente a una región Fc o derivado de ella. La fusión de Fc se entiende en la presente como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina receptora" (a veces con guiones) tal como se usa en la técnica anterior (Chamow y otros, 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión de Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con una pareja, que generalmente puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. La función de la parte no-Fc de una fusión de Fc, es decir, la pareja de fusión, puede ser mediar la unión del objetivo, y así es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo.

Por "receptor gamma Fc" o "Fc γ R" como se usa en la presente se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc de los anticuerpos IgG y que están codificados sustancialmente por los genes Fc γ R. En los

- seres humanos esta familia incluye, pero sin limitarse a los FcγRI (CD64), que incluyen las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluyen las isoformas FcγRIIa (que incluyen los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (que incluyen FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluyen las isoformas FcγRIIIa (que incluyen los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (que incluyen los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), así como también cualquier isoformas o alotipos FcγRs o FcγR humanos no descubiertos. Un FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero sin limitarse a los seres humanos, los ratones, las ratas, los conejos y los monos. Los FcγRs de ratón incluyen pero sin limitarse a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como también cualquier isoformas o alotipos FcγRs o FcγR de ratón no descubiertos.
- 5 Por "ligando de Fc" o "ligando efector" como se usa en la presente se entiende una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se una a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo ligando Fc / Fc. La unión de un ligando Fc a Fc preferentemente produce una o más función efectoras. Los ligandos de Fc incluyen pero sin limitarse a receptores Fc, FcγRs, FcαRs, FcεRs, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A de *estafilococos*, proteína G de *streptococos*, y los FcR virales. Los ligandos de Fc además incluyen los homólogos de receptores Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos al FcγRs (Davis y otros, 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas desconocidas que se unan al Fc.
- 10 Por "IgG" como se usa en la presente se entiende un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen gamma inmunoglobulínico reconocido. En los humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. En los ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Por "inmunoglobulina (Ig)" en la presente se entiende una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitarse a, los anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener un número de formas estructurales, que incluyen pero sin limitarse a anticuerpos en toda su extensión, fragmentos de anticuerpos y dominios de inmunoglobulina individuales. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en la presente se entiende una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta como se asegura por una persona con experiencia en la técnica de la estructura de las proteínas. Los dominios Ig típicamente tienen una topología característica de plegamiento β-sándwich. Los dominios de Ig conocidos de la clase IgG de anticuerpos son V_H, Cγ1, Cγ2, Cγ3, V_L, y C_L.
- 20 Por "polipéptido parental" o "polipéptido precursor" (que incluyen Fc parental o precursores) como se usa en la presente se entiende un polipéptido que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho polipéptido parental puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o versión modificada de un polipéptido de origen natural.. El polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a las composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. En consecuencia, por "polipéptido Fc parental" como se usa en la presente se entiende un polipéptido Fc que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo parental" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que se modifica para generar un anticuerpo variante.
- 25 Como se señaló anteriormente, pueden alterarse ciertas posiciones de la molécula de Fc. Por "posición" como se usa en la presente se entiende un lugar en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden ser numeradas secuencialmente, o de acuerdo a un formato establecido, por ejemplo, el índice de la UE tal como en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo IgG1 humano. Las posiciones correspondientes se determinan como se señaló anteriormente, generalmente a través de la alineación con otras secuencias parentales.
- 30 Por "residuos" como se usa en la presente se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácidos asociada. Por ejemplo, la asparagina 297 (además referida como Asn297, además referida como N297) es un residuo en el anticuerpo IgG1 humano.
- 35 Por "antígeno objetivo" como se usa en la presente se entiende la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno objetivo puede ser una proteína, un carbohidrato, un lípido, u otro compuesto químico.
- 40 Por "célula objetivo" como se usa en la presente se entiende una célula que expresa un antígeno objetivo.
- 45 Por "región variable" como se usa en la presente se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig sustancialmente codificados por cualquiera de los genes V_k, V_λ y/o V_H que componen los loci genéticos kappa, lambda, y de la cadena pesada de inmunoglobulina respectivamente.
- 50 Por "polipéptido variante" como se usa en la presente se entiende una secuencia de polipéptido que difiere de la de una secuencia de polipéptido parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. El polipéptido parental puede ser un polipéptido de origen natural o de tipo salvaje (TS), o puede ser una versión modificada de un polipéptido TS. El polipéptido variante puede referirse al polipéptido en sí mismo, a una composición que comprende el polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Preferentemente, el polipéptido variante tiene al menos una modificación de
- 55
- 60

aminoácidos en comparación con el polipéptido parental, por ejemplo de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con el parental. La secuencia de polipéptido variante en la presente descripción poseerá preferentemente al menos aproximadamente 80% de homología con una secuencia de polipéptido parental, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 90% de homología, con mayor preferencia al menos aproximadamente 95% de homología. En consecuencia, por "variante Fc" como se usa en la presente se entiende una secuencia Fc que difiere de aquella de una secuencia Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Una variante de Fc sólo puede abarcar una región Fc, o puede existir en el contexto de un anticuerpo, una fusión de Fc, una Fc aislada, un fragmento de Fc, u otro polipéptido que se codifique sustancialmente por la Fc. Una variante de Fc puede referirse al polipéptido Fc en sí mismo, a las composiciones que comprenden el polipéptido variante de Fc, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica.

Las variantes de Fc de la presente invención se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, I332E es una variante de Fc con la sustitución 1332E relacionada al polipéptido parental Fc. Igualmente, S239D/A330L/I332E (también conocido como 239D/330L/332E) define una variante Fc con las sustituciones S239D, A330L, y I332E (239D, 330L, y 332E) con relación al polipéptido Fc parental. Se señala que el orden en el cual las sustituciones se proporcionan es arbitrario, es decir que, por ejemplo, S239D/A330L/I332E es la misma variante de Fc que S239D/I332E/A330L, y así sucesivamente. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice EU o el esquema de numeración EU (Kabat y otros, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5o. Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice de la EU o índice de la EU como en Kabat se refiere a la numeración del anticuerpo de EU (Edelman y otros, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85).

La presente solicitud se dirige a variantes de la Fc optimizadas útiles en una variedad de contextos. Como se señaló anteriormente, las terapias de anticuerpos actuales sufren de una variedad de problemas. La presente solicitud proporciona un medio prometedor para mejorar la potencia antitumoral de anticuerpos que es a través de la mejora de su capacidad para mediar las funciones efectoras citotóxicas tales como ADCC, ADCP, y CDC. La presente solicitud muestra que los anticuerpos con una región Fc optimizada para la unión a ciertos FcγR pueden mediar mejor las funciones efectoras y así destruir células cancerosas de manera más eficaz en los pacientes. El equilibrio entre receptores de activación y de inhibición es una consideración importante, y una función efectora óptima puede resultar de una Fc con afinidad mejorada por receptores de activación, por ejemplo FcγRI, FcγRIIA/c, y FcγRIIIa, pero afinidad reducida por el receptor inhibitorio FcγRIIb. Además, debido a que los FcγR pueden mediar la captación de antígenos y el procesamiento por las células presentadoras de antígeno, una afinidad mejorada de Fc/FcγR puede mejorar, además, la capacidad de los anticuerpos terapéuticos para provocar una respuesta inmune adaptativa. Por ejemplo, varias mutaciones descritas en esta solicitud, que incluyen S298A, E333A, y K334A, muestran una unión mejorada al receptor de activación FcγRIIIa y una unión reducida al receptor inhibitorio FcγRIIb. Estas mutaciones pueden combinarse para obtener variantes de mutaciones dobles y triples que muestran mejoras aditivas en la unión. Una variante particular es un mutante triple S298A/E333A/K334A con un aumento de aproximadamente 1.7 veces en la unión al FcγRIIIa F158, una disminución de 5 veces en la unión al FcγRIIb, y una mejora de 2.1 veces en la ADCC.

Aunque existe una necesidad de una mayor función efectora, para algunos anticuerpos terapéuticos puede desearse la reducción o eliminación de la función efectora. Esto es frecuentemente el caso de anticuerpos terapéuticos cuyo mecanismo de acción implica bloquear o antagonizar, pero no destruir a las células que portan el antígeno objetivo. En estos casos no se desea la reducción de las células objetivo y esto puede considerarse como un efecto secundario. Por ejemplo, la capacidad de anticuerpos anti-CD4 para bloquear receptores CD4 en las células T los convierte en antiinflamatorios efectivos, sin embargo, su capacidad para reclutar receptores FcγR también dirige el ataque inmune contra las células objetivos, lo que resulta en la reducción de células T (Reddy y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933, incorporado como referencia). La función efectora también puede ser un problema para anticuerpos radiomarcados, denominados como radioconjugados, y anticuerpos conjugados con toxinas, denominados como inmunotoxinas. Estos fármacos pueden usarse para destruir células cancerosas, pero el reclutamiento de células inmunes a través de la interacción de Fc con FcγR trae células inmunes saludables a la proximidad de la carga útil mortal (radiación o toxina), lo que resulta en la reducción de tejido linfóide normal junto con las células cancerosas objetivos (Hutchins y otros, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; White y otros, 2001, Annu Rev Med 52:125-145). Este problema puede evitarse potencialmente mediante el uso de isotipos de IgG que reclutan pobremente el complemento o células efectoras, por ejemplo IgG2 e IgG4. Una solución alternativa es desarrollar variantes de Fc que reducen o producen la ablación de la unión (Alegre y otros, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins y otros, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Reddy y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604) (US 6,194,551; US 5,885,573; PCT WO 99/58572). Una consideración fundamental para la reducción o eliminación de la función efectora es que no se perturben otras propiedades importantes de los anticuerpos. Las variantes de Fc deben modificarse de manera que no sólo se produzca la ablación de la unión a FcγR y/o C1q, sino además que se mantenga la estabilidad, la solubilidad, y la integridad estructural de los anticuerpos, así como la capacidad para interactuar con otros importantes ligandos de Fc tales como FcRn y las proteínas A y G.

Además, la solicitud utiliza glicofomas modificadas que pueden mejorar la afinidad de Fc/FcγR y la función efectora. Una Fc no glicosilada con propiedades de solución favorables y la capacidad para mediar funciones efectoras sería significativamente favorable para los métodos de producción alternativos descritos anteriormente. Al superar las desventajas estructurales y funcionales de Fc no glicosiladas, pueden producirse anticuerpos en bacterias y plantas y animales transgénicos con un menor riesgo de inmunogenicidad, y con función efectora para aplicaciones clínicas en las que se desea la citotoxicidad tal como en el cáncer. La presente solicitud describe la utilización de métodos de ingeniería de proteínas para desarrollar variantes de Fc estables, solubles, con función efectora. Actualmente, tales variantes de Fc no existen en la técnica. Variantes de Fc de la presente solicitud

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en una variedad de polipéptidos Fc. Un polipéptido Fc que comprende una variante de Fc de la presente solicitud se denomina en la presente como un "polipéptido Fc de la presente solicitud". Los polipéptidos Fc de la presente solicitud incluyen polipéptidos que comprenden las variantes de Fc de la presente solicitud en el contexto de un polipéptido mayor, tal como un anticuerpo o fusión de Fc. Es decir, los polipéptidos Fc de la presente solicitud incluyen anticuerpos y fusiones de Fc que comprenden variantes de Fc de la presente solicitud. Por "anticuerpo de la presente solicitud" como se usa en la presente significa un anticuerpo que comprende una variante de Fc de la presente solicitud. Por "fusión de Fc de la presente solicitud" como se usa en la presente significa una fusión de Fc que comprende una variante de Fc de la presente solicitud. Los polipéptidos Fc de la presente solicitud incluyen, además, polipéptidos que comprenden poco o nada de una secuencia de polipéptido adicional distinta de la región Fc, denominados como un Fc aislado. Por "Fc aislado de la presente solicitud" usado en la presente se entiende un polipéptido Fc que comprende una variante de Fc de la presente solicitud, y comprende poco o nada de una secuencia de polipéptido adicional distinta de la región Fc. Los polipéptidos Fc de la presente solicitud incluyen, además, fragmentos de la región Fc. Por "fragmento de Fc de la presente solicitud" como se usa en la presente significa un fragmento de Fc que comprende una variante de Fc de la presente solicitud. Como se describe más abajo, cualquiera de los polipéptidos Fc de la presente solicitud antes mencionados puede estar fusionado a una o más parejas de fusión o parejas de conjugados para proporcionar propiedades funcionales deseadas.

Las variantes de Fc pueden construirse en un polipéptido Fc parental independientemente de su contexto. Es decir que, el único criterio para un polipéptido Fc parental es que comprenda una región Fc. Los polipéptidos Fc parentales descritos en la presente descripción pueden derivarse de una amplia variedad de fuentes, y pueden ser sustancialmente codificados por uno o más genes Fc de cualquier organismo, que incluyen pero sin limitarse a humanos, roedores que incluyen pero sin limitarse a ratones y ratas, lagomorfos que incluyen pero sin limitarse a conejos y liebres, camélidos que incluyen pero sin limitarse a camellos, llamas, y dromedarios, y primates no humanos, que incluyen pero sin limitarse a Prosimians, Platyrrhini (monos Nuevo Mundo), Cercopithecoidea (Old World monkeys), monos Viejo Mundo), y Hominoidea que incluyen los Gibones y Simios Menores y Grandes, los humanos son los más preferidos. Los polipéptidos Fc parentales de la presente solicitud pueden ser sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpo, que incluyen pero sin limitarse a secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos de IgG (que incluyen las subclases de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humana), IgA (que incluyen las subclases de IgA1 e IgA2 humana), IgD, IgE, IgG, o IgM. con la máxima preferencia los polipéptidos Fc parentales de la presente solicitud comprenden las secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos de IgG humana. Por ejemplo, el polipéptido Fc parental puede ser un anticuerpo parental, por ejemplo un anticuerpo de IgG1 humana, un anticuerpo de IgA humana, o un anticuerpo de IgG2a o IgG2b de ratón. Dicho anticuerpo parental puede ser no humano, quimérico, humanizado o completamente humano como se describe en detalle más abajo. El polipéptido Fc parental puede modificarse o diseñarse de alguna manera, por ejemplo un anticuerpo parental puede tener afinidad madurada, o puede poseer glicofomas modificadas, todo como se describe más completamente más abajo. Alternativamente, el polipéptido Fc parental puede ser una fusión de Fc, por ejemplo una fusión de Fc en donde la pareja de fusión se dirige a un receptor de superficie celular. Alternativamente, el polipéptido Fc parental puede ser una región Fc aislada, que comprende poco o nada de otra secuencia de polipéptido fuera de la región Fc. El polipéptido Fc parental puede ser una región Fc que existe naturalmente, o puede ser una variante existente modificada de un polipéptido Fc. Lo que es importante es que el polipéptido Fc parental comprende una región Fc, que después puede mutarse para generar una variante de Fc.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ser un anticuerpo, denominado en la presente descripción como un "anticuerpo de la presente solicitud". Los anticuerpos de la presente solicitud pueden comprender secuencias de inmunoglobulinas que sustancialmente están codificadas por genes de inmunoglobulinas que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos, que incluyen pero sin limitarse a las clases de anticuerpos de IgG (que incluye las subclases de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humanas), IgA (que incluye las subclases de IgA1 e IgA2 humanas), IgD, IgE, IgG, e IgM. Con la máxima preferencia los anticuerpos de la presente solicitud comprenden secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos de IgG humana. Los anticuerpos de la presente solicitud pueden ser no humanos, quiméricos, humanizados, o totalmente humanos. Como se apreciará por un experto en la técnica, estos diferentes tipos de anticuerpos reflejan el grado de "humanidad" o nivel potencial de inmunogenicidad en un ser humano. Para una descripción de estos conceptos, ver Clark y otros, 2000 y las referencias citadas en la misma (Clark, 2000, Immunol Today 21:397-402). Los anticuerpos quiméricos comprenden la región variable de un anticuerpo no humano, por

ejemplo los dominios V_H y V_L de origen de ratón o rata, unido operativamente a la región constante de un anticuerpo humano (ver, por ejemplo patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567). Dicha región variable no humana puede derivarse de cualquier organismo como se describió anteriormente, preferentemente mamíferos y con la máxima preferencia roedores o primates. En una modalidad, el anticuerpo de la presente solicitud comprende dominios variables de mono, por ejemplo como e describe en Newman y otros, 1992, *Biotechnology* 10:1455-1460, US 5,658,570, y US 5,750,105. En una modalidad preferida, la región variable se deriva de una fuente no humana, pero su inmunogenicidad se ha reducido mediante el uso de la ingeniería de proteínas. En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente solicitud son humanizados (Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies*, *Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA)). Por anticuerpo "humanizado" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que comprende una región marco (FR) humana y una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no-humano (usualmente ratón o rata). El anticuerpo no humana que proporciona las CDR se llama el "donador" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se llama el "aceptor". La humanización se basa principalmente en el injerto de CDR donantes en marcos aceptores (humanos) V_L y V_H (Winter US 5,225,539). Esta estrategia se denomina como "injerto de CDR". La "retromutación" de los residuos del marco aceptor seleccionados a los residuos donantes correspondientes se requiere frecuentemente para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5,530,101; US 5,585,089; US 5,693,761; US 5,693,762; US 6,180,370; US 5,859,205; US 5,821,337; US 6,054,297; US 6,407,213). Un gran número de otros métodos para la humanización son conocidos en la técnica (Tsurushita & Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal antibodies*, *Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (USA)), y cualquiera de tales métodos pueden encontrar uso en la presente invención para modificar las variantes de la Fc para reducir la inmunogenicidad. El anticuerpo humanizado óptimamente además comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana y así típicamente comprenderá una región Fc humana. En una modalidad preferida, la inmunogenicidad de una variante Fc de la presente solicitud se reduce con el uso de un método descrito en USSN 11/004,590, presentada el 3 de diciembre de 2004, titulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof.". En una modalidad alternativa, los anticuerpos de la presente solicitud pueden ser completamente humanos, es decir que las secuencias de los anticuerpos son completamente o sustancialmente humanas. Una serie de procedimientos son conocidos en la técnica para generar anticuerpos completamente humanos, incluyendo el uso de ratones transgénicos (Bruggemann y otros, 1997, *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos acoplados con métodos de selección (Griffiths y otros, 1998, *Curr Opin Biotechnol* 9:102-108).

Las variantes de Fc de la presente solicitud puede ser una fusión Fc, referida en la presente descripción como una "fusión Fc de la presente solicitud". Las fusiones de Fc de la presente solicitud comprenden un polipéptido Fc operativamente unido a una o más parejas de fusión. El papel de la pareja de fusión típicamente, pero no siempre, es mediar en la unión de la fusión de Fc a un antígeno objetivo. (Chamow y otros, 1996, *Trends Biotechnol* 14:52-60; Ashkenazi y otros, 1997, *Curr Opin Immunol* 9:195-200). Por ejemplo, el fármaco aprobado alefacept (comercializado como AMEVIVE®) es una fusión de Fc inmunosupresora que consiste en la porción extracelular que se une a CD2 del antígeno 3 asociado a la función leucocitaria (LFA-3) humano, unida a la región Fc de la IgG1 humana. El fármaco aprobado etanercept (comercializado como ENBREL®) es una fusión de Fc que comprende la porción extracelular de unión al ligando del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) humano, unida al Fc de la IgG1 humana. Virtualmente cualquier proteína, polipéptido, péptido, o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión incluyen pero sin limitarse a receptores y dominios extracelulares de receptores, moléculas de adhesión, ligandos, enzimas, citocinas, quimocinas, o alguna otra proteína o dominio proteico. La pareja de fusión puede jugar, además, un papel como quimioatrayente. Los ligandos o receptores no descubiertos pueden servir como parejas de fusión para las variantes de Fc de la presente solicitud. Las moléculas pequeñas pueden servir como parejas de fusión, y pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión de Fc a un objetivo terapéutico. Tales objetivos pueden ser cualquier molécula, preferentemente, un receptor extracelular que esté implicado en la enfermedad. Dos familias de receptores de superficie que son objetivos de un número de fármacos moleculares pequeños aprobados son los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), y los canales iónicos, que incluyen canales de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Casi el 70% de todos los fármacos comercializados actualmente en todo el mundo se dirigen a GPCR. Por lo tanto las variantes de Fc de la presente invención pueden fusionarse a una molécula pequeña que se dirija, por ejemplo, a uno o más receptores del GABA, receptores purinérgicos, receptores adrenérgicos, receptores histaminérgicos, receptores de opioides, receptores de quimocinas, receptores de glutamato, receptores nicotínicos, el receptor de 5HT (serotonina), y receptores de estrógeno. Una pareja de fusión puede ser una molécula pequeña mimética de una proteína que se dirige a un objetivo terapéuticamente útil. Ejemplos específicos de determinados fármacos que pueden servir como parejas de fusión de Fc pueden encontrarse en L. S. Goodman y otros, Eds., *Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics* (McGraw-Hill, Nueva York, ed. 9, 1996). Las parejas de fusión no sólo incluyen moléculas y proteínas pequeñas que se unen a objetivos conocidos de fármacos existentes, sino receptores huérfanos que aún no existen como objetivos farmacológicos. La finalización de los proyectos del genoma y proteoma está demostrando ser una fuerza impulsora en el descubrimiento de fármacos, y estos proyectos han generado un tesoro de receptores huérfanos. Existe un enorme potencial para validar estas nuevas moléculas como objetivos farmacológicos y desarrollar agentes terapéuticos de proteínas y pequeñas moléculas que se dirijan a ellos. Tales agentes terapéuticos de proteínas y moléculas pequeñas se contemplan como parejas de fusión de Fc que emplean las variantes de Fc de la presente solicitud. Las fusiones de Fc pueden comprender secuencias de inmunoglobulinas que están codificadas

5 sustancialmente por genes de inmunoglobulinas que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos, que incluyen pero sin limitarse a las clases de anticuerpos IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 humanas), IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2 humanas), IgD, IgE, IgG, e IgM. Con la máxima preferencia las fusiones de Fc de la presente solicitud comprenden secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos de IgG humana. Una variedad de enlazadores, definidos y descritos más abajo, pueden usarse para unir covalentemente la Fc a una pareja de fusión para generar una fusión de Fc.

10 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en una Fc aislada, es decir un polipéptido Fc que comprende poco o nada de una secuencia de polipéptido adicional distinta de la región Fc y que comprende una variante de Fc de la presente solicitud. Las Fc aisladas de la presente solicitud se entienden como moléculas en donde la función deseada de la molécula, por ejemplo la función terapéutica deseada, reside únicamente en la región Fc. Así, el objetivo terapéutico de una Fc aislada de la presente solicitud es probable que involucre uno o más ligandos de Fc. Una Fc aislada que comprende la variante de Fc puede no necesitar una secuencia de polipéptido adicional covalente para lograr su resultado deseado. En una modalidad preferida, dicha Fc aislada comprende del 90 - 100% de la región Fc, con poca o ninguna secuencia "extra". Por lo tanto, por ejemplo, una Fc aislada de la presente solicitud puede comprender los residuos C226 o P230 al carboxilo-terminal de la IgG1 humana, en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En una modalidad, la Fc aislada de la presente solicitud puede no contener una secuencia extra fuera de la región Fc. Sin embargo, se contempla además que la Fc aislada puede, además, no comprender secuencias de polipéptidos adicionales. Por ejemplo, una Fc aislada puede, además de que comprende una variante de Fc de la región Fc, comprender etiquetas de la secuencia de polipéptidos adicionales que permiten la expresión, purificación, y similares.

25 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en un fragmento de la región Fc, que es un polipéptido Fc que comprende un fragmento de Fc que comprende una variante de Fc de la presente solicitud. Evidentemente un requisito de un fragmento de Fc de la presente solicitud es que contenga la(s) posición(es) en la(s) que se realizan las modificaciones de aminoácidos de la variante de Fc. Un fragmento de Fc de la presente solicitud puede comprender del 1 - 90% de la región Fc, donde se prefiere del 10 - 90%, y donde del 30 - 90% es el más preferido. Así por ejemplo, un fragmento de Fc de la presente solicitud puede comprender una variante de Fc del dominio Cy2 de la IgG1, una variante de Fc del dominio Cy2 y la región bisagra de la IgG1, una variante de Fc del dominio Cy3 de la IgG1, etcétera. En una modalidad, un fragmento de Fc de la presente solicitud comprende adicionalmente una pareja de fusión, lo que lo convierte efectivamente en una fusión de fragmento de Fc. Al igual que con Fc aislados, los fragmentos de Fc pueden o no contener una secuencia de polipéptido adicional.

35 Las variantes de la Fc de la presente solicitud pueden codificarse sustancialmente por genes de cualquier organismo, preferentemente mamíferos, que incluyen pero sin limitarse a humanos, roedores que incluyen pero sin limitarse a ratones y ratas, lagomorfos que incluyen pero sin limitarse a conejos y liebres, camélidos que incluyen pero sin limitarse a camellos, llamas, y dromedarios, y primates no humanos, que incluyen pero sin limitarse a Prosimians, Platyrrhini (monos Nuevo Mundo), Cercopithecoidea (monos Viejo Mundo), y Hominoidea que incluyen los Gibones y Simios Menores y Grandes. En una modalidad más preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud son sustancialmente humanas. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden estar codificadas sustancialmente por genes de inmunoglobulinas que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. En una modalidad más preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud comprenden secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos IgG, que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 humanas. En una modalidad alternativa, las variantes de Fc de la presente invención comprenden secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2 humanas), IgD, IgE, IgG, o IgM. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden comprender más de una cadena proteica. Es decir, la presente solicitud puede encontrar uso en una variante de Fc que es un monómero o un oligómero, que incluye un homo- o hetero-oligómero.

50 En la modalidad más preferida, los polipéptidos Fc de la solicitud se basan en secuencias de IgG humana, y así las secuencias de IgG humanas se usan como las secuencias de "base" contra las cuales se comparan otras secuencias, que incluyen pero sin limitarse a secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedores y primates, así como secuencias de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgGD, IgGM, y similares. Se contempla que, aunque las variantes de Fc de la presente solicitud están modificadas en el contexto de una variante de Fc parental, las variantes pueden modificarse en o "transferirse" al contexto de otra, segunda variante de Fc parental. Esto se hace determinando los residuos y sustituciones "equivalentes" o "correspondientes" entre la primera y segunda variantes Fc, típicamente basadas en homología estructural o de secuencias entre las secuencias de las dos variantes Fc. Con el fin de establecer homología, la secuencia de aminoácido de una primera variante Fc señalada en la presente se compara directamente con la secuencia de una segunda variante Fc. Después de alinear las secuencias mediante el uso de uno o más de los programas conocidos en la materia de alineación de homología (por ejemplo mediante el uso de residuos conservados entre especies), que permiten inserciones necesarias y deleciones con el fin de mantener la alineación (por ejemplo evitando la eliminación de residuos conservados mediante deleciones e inserciones arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante Fc. La alineación de residuos conservados preferentemente debe conservar 100% de esos residuos. Sin embargo, a las alineaciones de

residuos conservados mayores que el 75% o tan pequeñas como el 50% son además adecuadas definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes pueden definirse además mediante la determinación de la homología estructural entre una primera y segunda variante Fc que es a nivel de estructura terciaria para las variantes de la Fc cuyas estructuras han sido determinadas. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido particular del parental o precursor (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están dentro de 0.13 nm y preferentemente 0.1 nm después de la alineación. La alineación se logra después que se ha orientado el mejor modelo y posicionado para dar el máximo solapamiento de las coordenadas atómicas de átomos de proteínas sin hidrógeno. Independientemente a cómo se determinan los residuos equivalentes o correspondientes e independientemente a la identidad de la variante Fc parental en los que las variantes de Fc se elaboran, que se entiende que están convoyadas, es que las variantes de Fc descubiertas por la presente solicitud pueden modificarse en cualquier segunda variante Fc parental que tiene homología estructural y de secuencia significativa con dicha variante Fc. Así, por ejemplo, si un anticuerpo variante se genera en donde el anticuerpo parental es IgG1 humana, mediante el uso de los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar los residuos equivalentes, dicho anticuerpo variante puede diseñarse en otro anticuerpo parental IgG2 humano, un anticuerpo parental IgA humano, un anticuerpo parental IgG2a o IgG2b de ratón, y similares. De nuevo, como se describió anteriormente, el contexto de la variante de Fc parental no afecta la capacidad para transferir las variantes de Fc de la presente invención a otras variantes de la Fc parentales. Por ejemplo, los anticuerpos variantes que se han diseñado en un anticuerpo IgG1 humano que se dirige a un epítipo pueden transferirse a un anticuerpo IgG2 humano que se dirige a un epítipo diferente, en una fusión de Fc que comprende una región Fc de IgG1 humana que se dirige aún a un epítipo diferente, etcétera.

Las variantes de la Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en una amplia variedad de productos. En una modalidad la variante de Fc de la solicitud es un agente terapéutico, de diagnóstico, o un reactivo de investigación, preferentemente un agente terapéutico. Alternativamente, la variante de Fc de la presente solicitud puede usarse para usos agrícolas o industriales. Un anticuerpo de la presente solicitud puede encontrar uso en una composición de anticuerpos que es monoclonal o policlonal. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ser agonistas, antagonistas, neutralizantes, inhibidores, o estimuladores. En una modalidad preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud se usan para destruir células objetivos que portan el antígeno objetivo, por ejemplo células cancerosas. En una modalidad alternativa, las variantes de Fc de la presente solicitud se usan para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno objetivo. En una modalidad preferida alternativa, las variantes de Fc de la presente solicitud se usan para bloquear, antagonizar, o agonizar el antígeno objetivo y destruir las células objetivos que portan el antígeno objetivo.

Objetivos

Virtualmente cualquier antígeno puede dirigirse por las variantes de Fc de la presente solicitud, que incluyen pero sin limitarse a proteínas, subunidades, dominios, motivos, y/o epitopos que pertenecen a la siguiente lista de objetivos: 17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, Receptor de adenosina A1, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Addressinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPARTIC, Factor natriurético auricular, integrina av/b3, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2 BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor 3 del complemento (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, cAMP, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, cGMP, CINC, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina de *Clostridium perfringens*, Ckb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, factor acelerador de la desintegración, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebro), Dhh, digoxina, DNAM-1, Dnase, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina1, EpCAM, Ephrin B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor IIa,

Factor VII, Factor VIIIc, Factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrina, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, hormona folículo estimulante, Fractalkine, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GTR, Glucagon, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de la hormona del crecimiento, Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, glicoproteína de la envoltura gB de HCMV, glicoproteína de la envoltura gH de HCMV, HCMV UL, Factor de crecimiento hematópoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), glicoproteína gB del virus de herpes simplex (HSV), glicoproteína gD de HSV, HGFA, Antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HIV gp120, lazo V3 de HIV IIIB gp 120, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardíaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGF1BP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, Cadena A de insulina, Cadena B de insulina, factor de crecimiento tipo insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6, , Calicreína 11, Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR, Factor de crecimiento de queratinocito (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1 latente, TGF-1 BP1 latente, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, Antígeno Lewis Y, Antígeno Lewis Y relacionado, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Surfactante pulmonar, hormona luteinizante, Receptor de Linfotóxina beta, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, sustancia inhibidora de Mullerian, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neprilisina, Neurotrofina-3,-4, o -6, Neurturina, Factor de crecimiento neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, hormona paratiroidea, PARC, PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGE, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, Cadena A de relaxina, Cadena B de relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, factores reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINA, albúmina sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína-72 asociada al tumor), TARC, TCA-3, Receptores de células T (por ejemplo, receptor de células T alfa/beta), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina tipo PLAP testicular , TFR, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan específico, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIb, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, trombina, Timo Ck-1, hormona estimulante de la tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Tissue Factor, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (Ligando TRAIL Apo-2, TL2), TNFSF11 (Ligando TRANCE/RANK ODF, Ligando OPG), TNFSF12 (Ligando TWEAK Apo-3, Ligando DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (Ligando LIGHT HVEM, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (Ligando GITR Ligando AITR, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 Ligando gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 Ligando CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Ligando Fas Ligando Apo-1, Ligando APT1), TNFSF7 (CD27 Ligando CD70), TNFSF8 (CD30 Ligando CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1 BB Ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de la transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno asociado a tumor CA 125, antígeno asociado a tumor que expresa carbohidratos relacionados con Lewis Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-cadherina, VE-cadherin-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, antígenos virales, VLA, VLA-1, VLA-4, integrina VNR , factor de von Willebrands, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para las hormonas y factores de crecimiento.

Un experto en la técnica apreciará que la lista de objetivos antes mencionada se refiere no sólo a proteínas y

biomoléculas específicas, sino a la vía o vías bioquímicas que los comprenden. Por ejemplo, la referencia a CTLA-4 como un antígeno objetivo implica que los ligandos y receptores que forman la vía co-estimuladora de células T, que incluye CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, y cualquiera de otros ligandos o receptores no descubiertos que se unen a estas proteínas, también son objetivos. Así un objetivo como se usa en la presente se refiere no sólo a una biomolécula específica, sino al conjunto de proteínas que interactúan con dicho objetivo y los miembros de la vía bioquímica a la que pertenecen dichos objetivos. Un experto en la técnica apreciará además que cualquiera de los antígenos objetivos antes mencionados, los ligandos o receptores que se unen a ellos, u otros miembros de su correspondiente vía bioquímica, pueden estar unidos operativamente a las variantes de Fc de la presente solicitud con el objetivo de generar una fusión de Fc. Así por ejemplo, una fusión de Fc que se dirige al EGFR podría construirse al unir operativamente una variante de Fc al EGF, TGF- β , o cualquier otro ligando, descubierto o por descubrir, que se una al EGFR. En consecuencia, una variante de Fc de la presente solicitud podría estar unida operativamente al EGFR con el objetivo de generar una fusión de Fc que se une al EGF, TGF- β , o cualquier otro ligando, descubierto o por descubrir, que se una al EGFR. Así, virtualmente cualquier polipéptido, ya sea un ligando, receptor, o alguna otra proteína o dominio proteico, que incluyen pero sin limitarse a los objetivos antes mencionados y las proteínas que componen sus correspondientes vías bioquímicas, puede unirse operativamente a las variantes de Fc de la presente solicitud para desarrollar una fusión de Fc.

La elección del antígeno objetivo adecuado para la terapia de anticuerpos es un proceso complejo y abarca muchas variables. Para un tratamiento contra el cáncer es deseable tener un objetivo cuya expresión este restringida a las células cancerosas. Algunos de los objetivos que han demostrado ser especialmente susceptibles a la terapia de anticuerpos son los que tienen funciones de señalización. Otros anticuerpos terapéuticos ejercen sus efectos al bloquear la señalización del receptor mediante la inhibición de la unión entre un receptor y su ligando afín. Otro mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos es causar una regulación negativa del receptor. Aunque muchos anticuerpos terapéuticamente eficaces trabajan en parte por la señalización a través de su antígeno objetivo, este no es siempre el caso. Por ejemplo, algunas clases de objetivos tales como las glicofomas de la superficie celular no generan ninguna señal biológica. Sin embargo, frecuentemente se asocian glicofomas alteradas con estados de enfermedad tal como el cáncer. Otro tipo significativo de objetivo son los que se internalizan ya sea como una función normal o en respuesta a la unión del anticuerpo. En el caso de los objetivos que son solubles en lugar de estar unidos a la superficie celular el reclutamiento de funciones efectoras no resultaría en ninguna muerte celular.

Algunos de los objetivos que han demostrado ser especialmente susceptibles a la terapia de anticuerpos son los que tienen funciones de señalización. Por ejemplo, la reticulación de anticuerpos del antígeno Her2/neu puede generar una señal apoptótica que resulta en la muerte de células cancerosas. En algunos casos tal como el antígeno CD30, esta agrupación con anticuerpo libre puede ser insuficiente para causar apoptosis in vitro. Para ensayos in vitro la agrupación suficiente puede estar mediada por el anticuerpo o al inmovilizarlo en una alta densidad a una superficie tal como el pocillo de una placa de microtitulación. Sin embargo, in vivo este efecto puede estar mediado por la unión del anticuerpo a los ligandos de Fc, por ejemplo Fc γ R expresados sobre una célula cercana. Las variantes de la Fc de anticuerpos que se unen más fuertemente a los ligandos de la Fc pueden así agrupar de manera más eficaz al objetivo de señalización y conducir a una mayor inducción de apoptosis. Un mecanismo de este tipo podría probarse experimentalmente al añadir un anticuerpo con y sin una unión mejorada del ligando de la Fc a las células que expresan el objetivo deseado que dan las señales, y/o añadir un receptor de Fc y un anticuerpo correspondiente que agrupará al receptor de Fc. Medios alternativos para la agrupación de receptores de Fc incluyen la inmovilización en perlas, y la sobre-expresión en una línea celular no efectora. Después de permitir que se produzca la apoptosis, la medición de la apoptosis relativa de las células que expresan el objetivo permitiría una determinación cuantitativa del efecto.

Los anticuerpos que provocan la muerte celular a través de su interacción con los objetivos pueden tener un beneficio adicional. Las señales liberadas por tales células moribundas atraen a macrófagos y otras células del sistema inmune. Estas células pueden después hacerse cargo de las células muertas o moribundas de una manera mediada por anticuerpos. Se ha demostrado que esto resulta en la presentación cruzada de antígenos y el potencial para una respuesta inmune del huésped contra las células objetivos. Tales auto-anticuerpos en respuesta a la terapia con anticuerpos se han reportado para los objetivos antigénicos Her2 y CD20. Por esta razón puede ser ventajoso tener variantes de la Fc con alteradas especificidades del receptor para estimular específicamente una presentación cruzada y una respuesta inmune en lugar del efecto no deseado de la inducción de tolerancia.

Otros anticuerpos terapéuticos ejercen sus efectos al inhibir la interacción entre un receptor y su ligando afín, al bloquear finalmente la señalización del receptor. Tales anticuerpos se usan para tratar muchos estados de enfermedad. En este caso puede ser ventajoso utilizar anticuerpos que no reclutan ninguna de las funciones inmunes del huésped. Un efecto secundario de un anticuerpo de este tipo puede ser en realidad inducir la propia señalización a través de la agrupación de receptores. En este caso el efecto terapéutico deseado de bloquear la señalización sería abrogado por la señalización mediada por el anticuerpo. Como se discutió anteriormente, este agrupamiento puede mejorarse mediante la interacción de los anticuerpos con las células que contienen un receptor de Fc. En este caso, sería preferible el uso de una variante de Fc que se une menos fuertemente o no se une en absoluto al receptor de Fc. Un anticuerpo de este tipo no mediaría la señalización, y su mecanismo de acción estaría restringido de esta manera al bloqueo de las

interacciones receptor/ligando. Los receptores de señalización para los que esto sería más apropiado serían probablemente receptores monoméricos que sólo pueden dimerizar pero no agruparse sustancialmente por un anticuerpo primario. Los receptores multiméricos pueden agruparse significativamente por el anticuerpo primario y pueden no requerir la agrupación adicional por la unión al receptor de Fc.

Otro posible mecanismo de acción de los anticuerpos terapéuticos es la regulación negativa del receptor. Tal puede ser el caso, por ejemplo, con el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina. El crecimiento celular depende de la señalización continua a través del receptor, mientras que en su ausencia las células dejan de crecer. Un efecto de los anticuerpos dirigidos contra este receptor es regular negativamente su expresión y de esta manera se produce la ablación de la señalización. La recuperación celular de la terapia citotóxica requiere la estimulación de este receptor. La regulación negativa de este receptor evita que estas células se recuperen y hace que la terapia citotóxica sea sustancialmente más eficaz. Para anticuerpos para los cuales este es el mecanismo de acción primario, una disminución de la unión al receptor de Fc puede evitar el secuestro del anticuerpo al unir moléculas no objetivos a los receptores de Fc.

Aunque muchos anticuerpos terapéuticamente eficaces trabajan en parte mediante la señalización a través de su antígeno objetivo, este no es siempre el caso. Por ejemplo, algunas clases de objetivos tales como glicofomas de la superficie celular no generan ninguna señal biológica. Sin embargo, frecuentemente las glicofomas alteradas se asocian con estados de enfermedad tal como el cáncer. En otros casos, la interacción de los anticuerpos con diferentes epítomos del mismo antígeno objetivo puede conferir diferentes efectos de señalización. En tales casos donde hay poca o ninguna señalización provocada por la unión del anticuerpo o fusión de Fc al antígeno objetivo, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar utilidad en proporcionar nuevos mecanismos de eficacia para moléculas no eficaces de otra manera.

Un enfoque que se ha tomado en la generación de anticuerpos terapéuticos para tales objetivos de no señalización es acoplar el anticuerpo a un agente citotóxico tal como un radioisótopo, toxina, o una enzima que procesará un sustrato para producir un agente citotóxico en la vecindad del tumor. Como una alternativa a una porción citotóxica, las variantes de la Fc de la presente solicitud pueden proporcionar un mayor reclutamiento de funciones inmunológicas que son inherentemente menos tóxicas para el huésped mientras que todavía son eficaces en la destrucción de las células cancerosas objetivos. Tales variantes de la Fc pueden, por ejemplo, ser más eficientes en reclutar células NK o en activar la fagocitosis o iniciar la CDC. Alternativamente, si se utiliza un agente citotóxico, puede ser ventajoso usar una variante de Fc que proporcione una reducción o alteración de la unión al ligando de Fc. Esto puede reducir o producir la ablación de los efectos citotóxicos del agente en las células inmunes que expresan receptores de Fc, lo que reduce así la toxicidad para el paciente. Además, la reducción de la unión al ligando de Fc puede ayudar a minimizar la generación de una respuesta inmune al agente tóxico o enzima. Como se mencionó anteriormente, la muerte celular puede resultar en el reclutamiento de células inmunes del huésped; en tal caso la presentación cruzada mediada por anticuerpos puede aumentarse con la respuesta inmune en lugar de la tolerancia inmune si además de una porción citotóxica el anticuerpo terapéutico ha aumentado la afinidad de la unión al receptor de la Fc o ha alterado la especificidad al receptor.

Otro tipo importante de objetivo son aquellos objetivos que se internalizan, ya sea como una parte normal de su función biológica o en respuesta a la unión de un anticuerpo. Para tales objetivos, se han realizado muchos esfuerzos para acoplar agentes citotóxicos tales como RNasa, ricina y caliqueamicina, que sólo pueden ejercer su efecto después de la internalización. Para tales reactivos, la unión de ligandos de la Fc puede reducir la eficacia debido al secuestro no productivo del agente terapéutico por los ligandos de la Fc. En este caso puede ser ventajoso utilizar variantes de la Fc que proporcionen una disminución de la afinidad por el ligando de la Fc. Por el contrario, la asociación previa del anticuerpo con los ligandos de la Fc antes de su unión al antígeno objetivo presentado sobre las células puede servir para inhibir la internalización del objetivo. En este caso, el aumento de la afinidad por los ligandos de la Fc puede servir para mejorar la asociación previa y de esta manera el reclutamiento de células efectoras y la respuesta inmune del huésped.

En el caso de los objetivos que son solubles en lugar de estar unidos a una superficie celular, el reclutamiento de funciones efectoras no resultaría directamente en muerte celular. Sin embargo, puede haber utilidad en estimular la generación de anticuerpos del hospedero para el objetivo. Para algunos estados de enfermedad, el tratamiento exitoso puede requerir la administración del anticuerpo terapéutico durante períodos de tiempo extremadamente largos. Tal terapia puede ser prohibitivamente costosa o complicada. En estos casos, la estimulación de la respuesta inmune del huésped y la generación de anticuerpos pueden resultar en una eficacia mejorada del agente terapéutico. Esto puede aplicarse como adyuvante a una terapia con vacunas. Las variantes de la Fc de anticuerpos que median un efecto de este tipo pueden tener una aumentada afinidad por los ligandos de la Fc o una alterada especificidad por los ligandos de la Fc.

Un número de anticuerpos y fusiones de Fc que están aprobados para su uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo pueden beneficiarse de las variantes de Fc de la presente solicitud. Estos anticuerpos y fusiones de Fc se denominan

en la presente como "productos y candidatos clínicos". Así, en una modalidad preferida, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en una variedad de productos y candidatos clínicos. Por ejemplo, un número de anticuerpos que se dirigen a CD20 pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente solicitud. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (ver, por ejemplo US 5,736,137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar el linfoma no Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente está siendo desarrollado por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en US 5,500,362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulada "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"). Un número de anticuerpos que se dirigen a los miembros de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, que incluyen EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente solicitud. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (ver, por ejemplo US 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™), actualmente está siendo desarrollado por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en US 4,753,894; cetuximab (Erbtux®, Imclone) (US 4,943,533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (US 6,235,883), actualmente está siendo desarrollado por Abgenix-ImmuneX-Amgen; HuMax-EGFr (USSN 10/172,317), actualmente está siendo desarrollado por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (US 5,558,864; Murthy y otros 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck y otros, 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough y otros, 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi y otros, 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi y otros, 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi y otros, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi y otros, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y el Centro de Inmunología Molecular, Cuba (US 5,891,996; US 6, 506,883; Mateo y otros, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth y otros 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138). En otra modalidad preferida, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath®, Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B. Los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en una variedad de anticuerpos o fusiones Fc que son sustancialmente similares a otros productos y candidatos clínicos, que incluyen pero sin limitarse a muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión Fc anti-LFA-3 desarrollado por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por MedImmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade™, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, etanercept (Enbrel®), una fusión Fc anti-TNFalfa desarrollado por ImmuneX/Amgen, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está siendo desarrollado por Abgenix, Pentumomab (R1549, ⁹⁰Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que está siendo desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), que está siendo desarrollado por Antisoma, HuBC-1, que está siendo desarrollado por Antisoma, Thioplatin (AS1407) que está siendo desarrollado por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que está siendo desarrollado por Biogen, VLA-1 mAb, un anticuerpo de integrina anti-VLA-1 que está siendo desarrollado por Biogen, LTBR mAb, un anticuerpo del receptor anti-linfotoxina (LTBR) que está siendo desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, J695, un anticuerpo anti-IL-12 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxin1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B™ un anticuerpo anti-Blys que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin™ (bevacizumab, rhuMab-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que está siendo desarrollado por Genentech, un anticuerpo de la familia del receptor anti-HER que está siendo desarrollado por Genentech, Anti-Tissue Factor (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular que está siendo desarrollado por Genentech, Xolair™ (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que está siendo desarrollado por Genentech, Raptiva™ (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que está siendo desarrollado por Genentech y Xoma, anticuerpo MLN-02 (antes LDP-02), que está siendo desarrollado por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que está siendo desarrollado por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-

152, un anti-CD23 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos del factor de migración anti-macrófago (MIF) que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico que está siendo desarrollado por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que está siendo desarrollado por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que está siendo desarrollado por Imclone, anticuerpos anti-VE cadherina que está siendo desarrollado por Imclone, CEA-Cide™ (labetuzumab), un anticuerpo del antígeno anti-carcinoembrionario (CEA) que está siendo desarrollado por Immunomedics, LymphoCide™ (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que está siendo desarrollado por Immunomedics, AFP-Cide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, LkoCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-070 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-018 que está siendo desarrollado por Medarex, Osidem™ (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 que está siendo desarrollado por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNF α que está siendo desarrollado por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina que está siendo desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos de la molécula-1 de adhesión anti-intercelular (ICAM-1) (CD54) que está siendo desarrollado por MorphoSys, MOR201, un receptor del factor 3 de crecimiento anti-fibroblasto (FGFR-3) que está siendo desarrollado por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF™, un anticuerpo anti-interferón gamma que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, Integrina Anti- $\alpha 5\beta 1$, que está siendo desarrollada por Protein Design Labs, anti-IL-12, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM que está siendo desarrollado por Xoma, y MLN01, un anticuerpo de integrina anti-Beta2 que está siendo desarrollado por Xoma.

La aplicación de los polipéptidos Fc a los productos y candidatos clínicos de los anticuerpos y fusiones de Fc antes mencionados no significa que está limitada a su composición precisa. Los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden incorporarse a los candidatos y productos clínicos antes mencionados, o a anticuerpos y fusiones de Fc que son sustancialmente similares a ellos. Los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden incorporarse a versiones de los candidatos y productos clínicos antes mencionados que son humanizados, de afinidad madurada, diseñados, o modificados de alguna otra manera. Además, el polipéptido entero de los productos y candidatos clínicos antes mencionados no necesita usarse para construir un nuevo anticuerpo o fusión de Fc que incorpora los polipéptidos Fc de la presente solicitud; por ejemplo puede usarse sólo la región variable de un producto clínico o anticuerpo candidato, una región variable sustancialmente similar, o una versión humanizada, de afinidad madurada, diseñada, o modificada de la región variable. En otra modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden encontrar uso en un anticuerpo o fusión de Fc que se une al mismo epítipo, antígeno, ligando, o receptor que uno de los productos y candidatos clínicos antes mencionados.

En una modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud se usan para el tratamiento de indicaciones autoinmunes, inflamatorias, o de trasplante. Los antígenos objetivo y productos y candidatos clínicos que son relevantes para tales enfermedades incluyen pero sin limitarse a anticuerpos de integrina anti- $\alpha 4\beta 7$ tales como LDP-02, anticuerpos de integrina anti-beta2 tales como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) tales como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 tales como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3, SMART anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD14 tales como IC14, anticuerpos anti-CD18, anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 tales como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 tales como IDEC-114, anticuerpos anti-CD147 tales como ABX-CBL, anticuerpos anti-E-selectina tales como CDP850, anticuerpos anti-gp11b/IIIa tales como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 tales como ICM3, anticuerpos anti-ICE tales como VX-740, anticuerpos anti-FcR1 tales como MDX-33, anticuerpos anti-IgE tales como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 tales como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 tales como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 tales como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma, anticuerpos anti-TNF (TNF, TNF α , TNF α , TNF-alfa) tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden utilizarse en moléculas inhibitoras de TNF para proporcionar mejores propiedades. Se demostró que la función efectora asociada con Fc γ RIIIa puede impactar negativamente la efectividad de ciertas moléculas inhibitoras de TNF usadas en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide o artritis psoriásica que tienen polimorfismo de alta afinidad (158 F:V discutido en la presente descripción en otra parte) y vice-versa (Z. Tutuncu y otros, 2004, "FcR Polymorphisms and Treatment Outcomes in Patients with Inflammatory Arthritis Treated with TNF Blocking Agents", presentación oral el 18 de octubre de 2004 en el 2004 ACR Meeting, San Antonio, TX; resumen publicado en Arthritis & Rheumatism, septiembre de 2004). Generalmente para afecciones autoinmunes tales como la artritis reumatoide o la artritis psoriásica, la combinación de un inhibidor de TNF con una variante de Fc que proporciona una unión reducida a uno o más Fc γ R en comparación con la parental mejora la eficacia de la terapia. Idealmente, la unión reducida o incluso la ablación de la unión a uno o más Fc γ R, por ejemplo Fc γ RIIIa, con una molécula inhibitora de TNF produciría los mejores resultados.

Las moléculas inhibitoras de TNF útiles incluyen cualquier molécula que inhiba la acción del TNF-alfa en un mamífero. Los ejemplos adecuados incluyen la fusión de Fc Enbrel® (etanercept) y los anticuerpos Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab). Los anticuerpos monoclonales (tales como Remicade y Humira) modificados mediante el uso de las variantes de Fc de la presente invención para reducir la unión de la Fc, pueden traducirse en una mejor eficacia. La función efectora de Humira, Remicade, y Enbrel no se consideró en el desarrollo de estos fármacos, y mucho menos la modulación de la función efectora. Mediante el uso de una variante de Fc de la presente solicitud que reduce la unión a uno o más FcγR en el contexto de un anticuerpo o fusión de Fc que actúa sobre afecciones autoinmunes, la eficacia puede mejorarse en comparación con los productos actualmente comercializados. Las moléculas inhibitoras de TNF útiles incluyen preferentemente las moléculas de TNF negativo dominante (como se definió en USSN 09/798,789, presentada el 2 de marzo de 2000; 09/981,289, presentada el 15 de octubre de 2001; 10/262,630, presentada el 30 de septiembre de 2002; y 10/963,994, presentada el 12 de octubre de 2004). Las moléculas de TNF negativo dominante (DN-TNF) no tienen actividad efectora intrínseca, y actúan para "salvar" el TNF de transmembrana (tmTNF) (es decir, si la destrucción de las células que contienen tmTNF tiene un efecto negativo en el resultado de la enfermedad para la artritis reumatoide o psoriásica). Se prefiere una molécula de DN-TNF asociada con una variante de Fc que reduzca o provoque la ablación de la unión de FcγR al receptor.

En una modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud funcionan terapéuticamente, totalmente o en parte, a través de la actividad ADCC. Los antígenos objetivo y productos y candidatos clínicos que son relevantes para tal aplicación pueden incluir pero sin limitarse a: anticuerpos anti-CD20 tales como Bexocar, Rituxan®, Zevalin®, y anticuerpos PRO70769, anti-CD33 tales como Smart M195, anticuerpos anti-CD22 tales como Lymphocide™, anticuerpos anti-CD30 tales como AC-10 y SGN-30, anticuerpos anti-EGFR tales como ABX-EGF, Cetuximab, IMC-C225, Merck Mab 425, anticuerpos anti-EpCAM tales como Crucell's anti-EpCAM, anticuerpos anti-HER2 tales como Herceptina y MDX-210, y anticuerpos anti-CEA tales como cantumab y Pentacea.

En una modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud funcionan terapéuticamente, totalmente o en parte, a través de la actividad CDC. Los antígenos objetivo y productos y candidatos clínicos que son relevantes para tal aplicación pueden incluir pero sin limitarse a: anticuerpos anti-CEA tales como cantumab y Pentacea, anticuerpos anti-CD20 tales como Bexocar, Rituxan®, Zevalin®, y PRO70769, anticuerpos anti-EpCAM tales como Crucell's anti-EpCAM y Edrecolomab, y anticuerpos anti-CD52 tales como Campath® (alemtuzumab).

En una modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud se dirigen contra los antígenos expresados en el linaje hematológico. Los antígenos objetivo y productos y candidatos clínicos que son relevantes para tal aplicación pueden incluir pero sin limitarse a: anti-CD33 anticuerpos tales como Smart M195, anti-CD40L anticuerpos tales como Antova™, IDEC-131, anti-CD44 anticuerpos tales como Bivatuzumab, anti-CD52 anticuerpos tales como Campath® (alemtuzumab), anti-CD80 anticuerpos tales como IDEC-114, anti-CTLA-4 anticuerpos tales como MDX-101, anti-CD20 anticuerpos tales como Bexocar, Rituxan®, Zevalin®, y PRO70769, anti-CD22 anticuerpos tales como Lymphocide™, anti-CD23 anticuerpos tales como IDEC-152, anti-CD25 anticuerpos tales como Zenapax® (daclizumab), y anti-MHC (HLA-DR) anticuerpos tales como apolizumab.

En una modalidad, los polipéptidos Fc de la presente solicitud se dirigen contra los antígenos expresados en tumores sólidos. Los antígenos objetivo y productos y candidatos clínicos que son relevantes para tal aplicación pueden incluir pero sin limitarse a: anticuerpos anti-EpCAM tales como Crucell's anti-EpCAM y Edrecolomab, anticuerpos anti-CEA tales como cantumab y Pentacea, anticuerpos anti-EGFR tales como ABX-EGF, Cetuximab, IMC-C225, Merck Mab 425, anticuerpos anti-Muc1 tales como BravaRex, TriAb, anticuerpos anti-Her2 tales como Herceptin®, MDX-210, anticuerpos anti-GD-2 gangliosido tales como 3F8 y TriGem, anticuerpos anti-GD-3 gangliosido tales como mitumomab, anticuerpos anti-PSMA tales como MDX-070, anticuerpos anti-CA125 tales como oregovomab, anticuerpos anti-TAG-72 tales como MDX-220, y anticuerpos anti-MUC-1 tales como cantuzumab.

En una modalidad preferida, el objetivo de las variantes de Fc de la presente solicitudes es en sí mismo uno o más ligandos Fc. Los polipéptidos Fc de la invención pueden utilizarse para modular la actividad del sistema inmune, y en algunos casos para imitar los efectos de la terapia de IVIg de una manera más controlada, específica y eficiente. IVIg es efectivamente una dosis alta de inmunoglobulinas suministradas por vía intravenosa. Generalmente, la IVIg se ha usado para regular negativamente las afecciones autoinmunes. Se ha planteado la hipótesis de que el mecanismo de acción terapéutico de la IVIg implica la ligación de receptores de Fc a alta frecuencia (J Bayry y otros, 2003, Transfusion Clinique et Biologique 10:165-169; Binstadt y otros, 2003, J Allergy Clin. Immunol, 697-704). De hecho, modelos animales de púrpura trombocitopénica (ITP) muestran que Fc aisladas son la porción activa de la IVIg (Samuelsson y otros; 2001, Pediatric Research 50(5), 551). Para el uso en la terapia, las inmunoglobulinas se recolectan a partir de miles de donantes, con todos los problemas concomitantes asociados con agentes bioterapéuticos no recombinantes obtenidos de seres humanos. Una variante de Fc de la presente solicitud debe servir para todos los roles de la IVIg al tiempo que se produce como una proteína recombinante en lugar de recolectarse de donantes.

Los efectos inmunomoduladores de la IVIg pueden depender de una interacción productiva con uno o más ligandos de

Fc, que incluyen pero sin limitarse a FcγR, proteínas del complemento, y FcRn. En algunas modalidades, las variantes de la Fc para su uso en la invención con mayor afinidad por FcγRIIb pueden usarse para promover actividad antiinflamatoria (Samuelsson y otros, 2001, Science 291: 484-486) y o reducir la autoinmunidad (Hogarth, 2002, Current Opinion in Immunology, 14:798-802). En otras modalidades, los polipéptidos Fc de la solicitud con una afinidad mejorada para uno o más FcγR pueden utilizarse por sí mismos o en combinación con modificaciones adicionales para reducir la autoinmunidad (Hogarth, 2002, Current Opinion in Immunology, 14:798-802). En modalidades alternativas, las variantes de Fc de la solicitud con afinidad mejorada para FcγRIIIa pero con capacidad reducida para la señalización intracelular pueden usarse para reducir la activación del sistema inmune al interferir competitivamente con la unión al FcγRIIIa. El contexto de la variante de Fc tiene un impacto dramático en la especificidad deseada. Por ejemplo, las variantes de la Fc que proporcionan una mejor unión a uno o más FcγR activadores pueden proporcionar efectos inmunomoduladores óptimos en el contexto de un anticuerpo, fusión de Fc, Fc aislada, o fragmento de Fc al actuar como un antagonista de FcγR (van Mirre y otros, 2004, J. Immunol. 173:332-339). Sin embargo, la fusión o conjugación de dos o más variantes de Fc pueden proporcionar diferentes efectos, y para un polipéptido Fc de este tipo puede ser óptima la utilización de variantes de la Fc que proporcionen afinidad mejorada por un receptor inhibidor.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden usarse como terapéuticos inmunomoduladores. La unión o el bloqueo de receptores de Fc sobre células del sistema inmune puede usarse para influir en la respuesta inmune en afecciones inmunológicas que incluyen pero sin limitarse a púrpura trombocitopénica idiopática (ITP) y artritis reumatoide (RA), entre otras. Con el uso de variantes de la Fc con afinidad mejorada de la presente solicitud pueden reducirse las dosis requeridas en aplicaciones típicas de IVIg, al tiempo que se obtiene un efecto terapéutico sustancialmente similar. Las variantes de Fc pueden proporcionar una mejor unión a un FcγR, que incluye pero sin limitarse a FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa, FcγRIIIb, y/o FcγRI. En particular, las mejoras de la unión a FcγRIIb aumentarían la expresión o la actividad inhibitoria, según se necesite, de ese receptor y mejorarían la eficacia. Alternativamente, el bloqueo de la unión a receptores de activación tales como FcγRIIIb o FcγRI puede mejorar la eficacia. Además, la afinidad modulada de las variantes de Fc por FcRn y/o además el complemento también pueden proporcionar beneficios.

En una modalidad, las variantes de la Fc que proporcionan una mejor unión al receptor inhibitorio FcγRIIb proporcionan una mejora al enfoque terapéutico de la IVIg. En particular, las variantes de Fc que se unen con mayor afinidad al receptor de FcγRIIb que el polipéptido Fc parental pueden usarse en la presente invención. Tales variantes de la Fc funcionarían por lo tanto como agonistas de FcγRIIb, y se espera que mejore los efectos beneficiosos de la IVIg como un agente terapéutico para una enfermedad autoinmune y además como un modulador de la proliferación de células B. Además, tales variantes de la Fc con mejoras para FcγRIIb pueden, además, modificarse adicionalmente para tener la misma unión o una unión limitada a otros receptores. En modalidades adicionales, las variantes de Fc con una afinidad mejorada por FcγRIIb pueden combinarse con mutaciones que reducen o producen la ablación a otros receptores, lo que de esta manera minimiza potencialmente aún más los efectos secundarios durante el uso terapéutico.

Tales aplicaciones inmunomoduladoras de las variantes de Fc de la presente solicitud pueden utilizarse, además, en el tratamiento de indicaciones oncológicas, especialmente aquellas para las cuales la terapia con anticuerpos implica mecanismos citotóxicos dependientes de anticuerpos. Por ejemplo, una variante de Fc que mejora la afinidad por FcγRIIb puede usarse para antagonizar este receptor inhibitorio, por ejemplo al unirse al sitio de unión del Fc/FcγRIIb pero fallar en la activación, o reducir la señalización celular, lo que mejora potencialmente el efecto de la terapia contra el cáncer basada en anticuerpos. Tales variantes de Fc, que funcionan como antagonistas de FcγRIIb, pueden ya sea bloquear las propiedades inhibitorias del FcγRIIb, o inducir su función inhibitoria como en el caso de la IVIg. Un antagonista de FcγRIIb puede usarse como co-terapia en combinación con cualquier otro agente terapéutico, que incluye pero sin limitarse a anticuerpos, que actúan sobre la base de la citotoxicidad relacionada con la ADCC. Las variantes de Fc antagónicas de FcγRIIb de este tipo son preferentemente Fc aisladas o fragmentos de Fc, aunque en modalidades alternativas pueden usarse anticuerpos y fusiones de Fc.

50 Propiedades Optimizadas

La presente solicitud proporciona variantes de la Fc que son optimizadas para un número de propiedades terapéuticamente relevantes. Una variante Fc comprende una o más de una modificación de aminoácidos con relación a un polipéptido Fc parental, en donde las modificaciones de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Una variante Fc de la presente solicitud difiere en la secuencia de aminoácido de su polipéptido Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Así, las variantes de la Fc de la presente solicitud tienen al menos una modificación de aminoácido comparado con el parental. Alternativamente las variantes de Fc de la presente solicitud pueden tener más de una modificación de aminoácido comparadas al parental, por ejemplo de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, preferentemente de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, y con la máxima preferencia de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparada al parental. Así las secuencias de las variantes de Fc y aquellas del polipéptido Fc parental son homólogas sustancialmente. Por ejemplo, las secuencias de la variante Fc variantes en la presente descripción poseerán aproximadamente 80% de homología con la secuencias de la variante Fc parental, de

preferencia al menos aproximadamente 90% de homología, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 95% de homología.

5 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden optimizarse por una variedad de propiedades. Una variante Fc que se modifica o se predice para exhibir una o más propiedades optimizadas se refiere en la presente descripción como una "variante Fc optimizada". Las propiedades que pueden optimizarse incluyen pero sin limitarse a afinidad aumentada o reducida por un FcγR. En una modalidad preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud se optimizan para tener afinidad mejorada por un FcγR de activación humano, preferentemente FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIIb, con la máxima preferencia FcγRIIIa. En una modalidad preferida alternativa, las variantes de Fc se optimizan para poseer afinidad reducida por el receptor inhibitorio humano FcγRIIb. Estas modalidades preferidas se anticipan para proporcionar polipéptidos Fc con propiedades terapéuticas en humanos, por ejemplo, función efectora mejorada y mayor potencia anticancerosa. En una modalidad alternativa, las variantes de Fc de la presente solicitud se optimizan para tener afinidad reducida o producir ablación para un FcγR humano, que incluyen pero sin limitarse a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIIb. Estas modalidades se anticipan para proporcionar polipéptidos Fc con propiedades terapéuticas mejoradas en humanos, por ejemplo función efectora reducida y toxicidad reducida. En otras modalidades, las variantes de la Fc de la presente solicitud proporcionan afinidad mejorada por uno o más FcγRs, incluso afinidad reducida por uno o más FcγRs distintos. Por ejemplo, una variante de la Fc de la presente solicitud puede tener una unión mejorada a FcγRIIIa, aún con una unión reducida a FcγRIIb. Alternativamente, una variante de la Fc de la presente solicitud puede tener una unión mejorada a FcγRIIa y FcγRI, aún con una unión reducida a FcγRIIb. En aún otra modalidad, una variante de Fc de la presente solicitud puede tener una afinidad mejorada por FcγRIIb, aún con una afinidad reducida a uno o más FcγR de activación.

25 Las modalidades preferidas comprenden la optimización de la Fc que se unen a un FcγR humano, sin embargo, en modalidades alternativas las variantes de la Fc de la presente solicitud poseen una afinidad mejorada o reducida por FcγR de organismos no humanos, que incluyen pero sin limitarse a roedores y primates no humanos. Las variantes de la Fc que se optimizan para la unión a un FcγR no humano pueden encontrar uso en la experimentación. Por ejemplo, los modelos de ratón están disponibles para una variedad de enfermedades que permiten pruebas de propiedades tales como la eficacia, toxicidad, y farmacocinética de un determinado candidato a fármaco. Como se conoce en la técnica, las células cancerosas se pueden injertar o inyectar en ratones para imitar un cáncer humano, un proceso conocido como xenoinjerto. Pruebas de variantes de la Fc que comprenden variantes de la Fc que se optimizan para uno o más FcγRs de ratón, pueden proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia de proteína, su mecanismo de acción, y similares. Las variantes de la Fc de la presente solicitud pueden optimizarse, además, para una funcionalidad y/o propiedades de la solución mejoradas en forma no glicosilada. En una modalidad preferida, las variantes de Fc no glicosiladas de la presente solicitud se unen a un ligando de Fc con mayor afinidad que la forma no glicosilada de la variante de Fc parental. Dichos ligandos de Fc incluyen pero sin limitarse a FcγR, C1q, FcRn, y las proteínas A y G, y pueden originarse de cualquier fuente que incluye pero sin limitarse a un ser humano, ratón, rata, conejo, o mono, preferentemente un ser humano. En una modalidad preferida alternativa, las variantes de la Fc se optimizan para ser más estables y/o más solubles que la forma no glicosilada de la variante de Fc parental.

40 Las variantes de la Fc de la solicitud pueden comprender modificaciones que modulan la interacción con los ligandos de Fc distintos de FcγRs, que incluyen pero sin limitarse a proteínas del complemento, FcRn, y homólogos al receptor de Fc (FcRHs). Los FcRH incluyen pero sin limitarse a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, y FcRH6 (Davis y otros, 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

45 Preferentemente, la especificidad al ligando de la Fc de la variante de Fc de la presente solicitud determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante dada de Fc para propósitos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno objetivo y de la enfermedad o indicación tratada. Para algunos objetivos e indicaciones, pueden preferirse funciones efectoras mejoradas mediadas por FcγR. Esto puede ser particularmente favorable para variantes de la Fc contra el cáncer. Así, pueden usarse variantes de la Fc que comprenden variantes de la Fc que proporcionan una afinidad mejorada por FcγR activadores y/o una afinidad reducida por FcγR inhibidores. Para algunos objetivos e indicaciones, puede ser más beneficioso utilizar variantes de la Fc que proporcionan una selectividad diferencial para diferentes FcγR activadores; por ejemplo, en algunos casos puede desearse una unión mejorada a FcγRIIa y FcγRIIIa, pero no a FcγRI, mientras que en otros casos, puede preferirse una unión mejorada solo a FcγRIIa. Para ciertos objetivos e indicaciones, puede preferirse utilizar variantes de la Fc que mejoran tanto las funciones efectoras mediadas por FcγR como las mediadas por el complemento, mientras que para otros casos puede ser ventajoso utilizar variantes de la Fc que mejoran las funciones efectoras mediadas por FcγR o las mediadas por el complemento. Para algunos objetivos o indicaciones de cáncer, puede ser ventajoso reducir o producir la ablación de una o más funciones efectoras, por ejemplo anular la unión a C1q, uno o más FcγR, FcRn, o uno o más de otros ligandos de Fc. Para otros objetivos e indicaciones, puede preferirse utilizar variantes de la Fc que proporcionen una unión mejorada al FcγRIIb inhibitorio, aún al nivel WT, con reducción o ablación de la unión a FcγR activadores. Esto puede ser particularmente útil, por ejemplo, cuando el objetivo de una variante de Fc es inhibir la inflamación o una enfermedad autoinmune, o modular el sistema inmune de alguna manera.

Evidentemente un parámetro importante que determina la selectividad más beneficiosa de una variante de la Fc dada para tratar una enfermedad dada es el contexto de la variante de la Fc, es decir qué tipo de variante de la Fc se está usando. Así, la selectividad o especificidad del ligando Fc de una variante dada de Fc proporcionará propiedades diferentes dependiendo de si este compone un anticuerpo, fusión de Fc, o una de las variantes de la Fc con una pareja de fusión o conjugado acoplada. Por ejemplo, una toxina, un radionucleótido, u otros conjugados pueden ser menos tóxicos para las células normales si la variante de la Fc que las comprenden tiene una reducción o ablación de la unión a uno o más ligandos de Fc. Como otro ejemplo, con el objetivo de inhibir la inflamación o enfermedad autoinmune, puede preferirse utilizar una variante de la Fc con una afinidad mejorada por FcγR activadores, tal como unirse a estos FcγR y evitar su activación. Por el contrario, una variante de Fc que comprende dos o más regiones de Fc con una afinidad mejorada por FcγRIIb puede co-acoplar con este receptor en la superficie de células inmunes, lo cual inhibe así la proliferación de estas células. Mientras en algunos casos una de las variantes de Fc puede acoplar con su antígeno objetivo en un tipo celular y aún acoplar con FcγR en células separadas del antígeno objetivo, en otros casos puede ser ventajoso acoplar con los FcγR en la superficie de las mismas células que el antígeno objetivo. Por ejemplo, si un anticuerpo se dirige a un antígeno sobre una célula que expresa, además, uno o más FcγR, puede ser beneficioso utilizar una variante de Fc que mejore o reduzca la unión a los FcγR en la superficie de esa célula. Este puede ser el caso, por ejemplo cuando la variante de la Fc se usa como un agente contra el cáncer, y el co-acoplamiento del antígeno objetivo y el FcγR en la superficie de la misma célula promueve eventos de señalización dentro de la célula que resultan en inhibición del crecimiento, apoptosis, u otro efecto anti-proliferativo. Alternativamente, el co-acoplamiento al antígeno y al FcγR sobre la misma célula puede ser ventajoso cuando la variante de la Fc se usa para modular el sistema inmune de alguna manera, en donde el co-acoplamiento del antígeno objetivo y el FcγR proporciona algún efecto proliferativo o anti-proliferativo. De manera similar, las variantes de la Fc que comprenden dos o más regiones Fc pueden beneficiarse de variantes de la Fc que modulan la selectividad o especificidad por FcγR para co-acoplar con FcγR sobre la superficie de la misma célula.

La especificidad al ligando de Fc de las variantes de Fc de la presente solicitud puede modularse para crear diferentes perfiles de funciones efectoras que pueden ser adecuados para determinados antígenos objetivos, indicaciones, o poblaciones de pacientes. La Tabla 1 describe varias modalidades preferidas de los perfiles de unión a receptores que incluyen mejoras, reducciones o ningún efecto en la unión a varios receptores, donde tales cambios pueden ser beneficiosos en ciertos contextos. Los perfiles de unión a receptores en la tabla pueden variar según el grado de aumento o disminución a los receptores especificados. Además, los cambios de unión especificados podrían ser en el contexto de cambios adicionales de la unión a otros receptores tales como C1q o FcRn, por ejemplo al combinarse con la ablación de la unión a C1q para apagar la activación del complemento, o al combinarse con una mejor unión a C1q para aumentar la activación del complemento. Son posibles otras modalidades con otros perfiles de unión a receptores, los perfiles de unión a receptores enumerados son ilustrativos.

Tabla 1

	Afinidad mejorada	Reducción de afinidad	Actividad de la célula	Actividad terapéutica
5				
10	FcγRI solamente	-	Mejoradas actividad y captación de células dendríticas y posterior presentación de antígenos Respuesta mejorada de monocitos y macrófagos al anticuerpo	Mejorada respuesta inmune basada en células contra el objetivo
15	FcγRIIIA	-	ADCC mejorada y fagocitosis de amplia gama de tipos de células	Incremento de la lisis celular objetivo
	FcγRIIIA	FcγRIIb	ADCC mejorada y fagocitosis de amplia gama de tipos de células	Incremento de la lisis celular objetivo
20	FcγRIIb	-	Actividad reducida de todos los tipos celulares que portan FcγR excepto las células NK	Mejora de la lisis de células objetivos selectiva para células objetivos accesibles para células NK
25	FcγRIIc	-	Posible activación de células NK a través de la señalización del receptor FcγRIIc	
	FcγRIIb	-	Posible activación específica de células NK y mejora de la ADCC mediada por células NK	Mejorada lisis de células objetivos, selectiva para células objetivos accesibles a células NK
30	FcγRIIIA	-		
35	FcγRIIb	-	Mejora de la fagocitosis mediada por neutrófilos	Mayor destrucción de células objetivos para células accesibles a neutrófilos
40	FcαR	-	Mejora de la fagocitosis mediada por neutrófilos	Mayor destrucción de células objetivos para células accesibles a neutrófilos
	FcγRI	FcγRIIb	Mejorada actividad de las células dendríticas	Mejorado basado en células respuesta inmune contra el objetivo
45	FcγRIIIa		y captación, y posterior presentación de antígenos a las células T	
	FcγRIIIA		Respuesta mejorada de monocitos y macrófagos al anticuerpo	
50	FcγRIIb	FcγRI	Actividad reducida de monocitos, macrófagos, neutrófilos, NK, células dendríticas y otras células que portan el receptor gamma	Eliminación o reducción de la citotoxicidad mediada por células contra células que portan el objetivo
		FcγRIIIa		
		FcγRIIIA		

55 La presencia de diferentes formas polimórficas de FcγR proporciona aún otro parámetro que tiene un impacto sobre la utilidad terapéutica de las variantes de Fc de la presente solicitud. Mientras que la especificidad y la selectividad de una variante de Fc dada para las diferentes clases de FcγR afectan significativamente la capacidad de una variante de Fc para dirigirse a un antígeno dado para el tratamiento de una enfermedad dada, la especificidad o la selectividad de una variante de Fc para diferentes formas polimórficas de estos receptores pueden, en parte, determinar qué investigación o experimentos preclínicos pueden ser adecuados para la prueba y, finalmente qué poblaciones de pacientes pueden responder al tratamiento o no. Así, la especificidad o selectividad de las variantes de la Fc de la presente solicitud para los polimorfismos del ligando Fc, que incluyen pero sin limitarse a para los polimorfismos del FcγR, C1 q, FcRn, y FcRH,

60

puede usarse para guiar la selección de una investigación válida y experimentos preclínicos, diseño de ensayos clínicos, selección de pacientes, dependencia de dosificación y/u otros aspectos concernientes a los ensayos clínicos.

Modificaciones Adicionales

- 5
- Además de comprender una variante Fc de la presente solicitud, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden comprender una o más modificaciones adicionales. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácidos, o pueden ser modificaciones que no son modificaciones de aminoácidos tales como modificaciones que se hacen enzimáticamente o químicamente. Se contemplan las combinaciones de modificaciones adicionales de aminoácidos y modificaciones que no son modificaciones de aminoácidos. Dicha modificación(es) adicional(es) probablemente proporciona alguna mejora en el polipéptido Fc, por ejemplo una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. La presente solicitud contempla una variedad de mejoras que se pueden hacer por el acoplamiento de las variantes de Fc de la presente solicitud con modificaciones adicionales.
- 10
- 15 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden combinarse con otras modificaciones de aminoácidos en la región Fc que proporcionan una interacción alterada u optimizada con uno o más ligandos de Fc, que incluyen pero sin limitarse a FcγRs, C1q u otras proteínas del complemento, FcRn, homólogos de FcR (FcRHs), y/o ligandos de Fc todavía no descubiertos. Se señala que los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden ellos mismos tener propiedades de interacción útiles todavía desconocidas con uno o más ligandos de Fc, por ejemplo FcRHs. Las modificaciones adicionales pueden proporcionar afinidad y/o especificidad alterada u optimizada para los ligandos de Fc. Las modificaciones adicionales pueden proporcionar funciones efectoras alteradas u optimizadas, que incluyen pero sin limitarse a ADCC, ADCP, CDC, y/o vida media en suero. Tal combinación puede proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas, o novedosas. En una modalidad, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden combinarse con variantes de Fc conocidas (Duncan y otros, 1988, Nature 332:563-564; Lund y otros, 1991, J Immunol 147:2657-2662; Lund y otros, 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre y otros, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins y otros, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis y otros, 1995, Immunol Lett 44:111-117; Lund y otros, 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis y otros, 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y otros, 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y otros, 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie y otros, 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy y otros, 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y otros, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie y otros, 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis y otros, 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta y otros, 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; Hinton y otros, 2004, J Biol Chem 279:6213-6216) (US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572; US 2004/0002587 A1), US 6,737,056, PCT US2004/000643, USSN 10/370,749, y PCT/US2004/005112). Por ejemplo, como se describe en US 6,737,056, PCT US2004/000643, USSN 10/370,749, y PCT/US2004/005112, las sustituciones S298A, S298D, K326E, K326D, E333A, K334A, y P396L proporcionan unión a FcγR optimizada y/o ADCC mejorada. Además, como se describe en Idusogie y otros, 2001, J Immunology 166:2571-2572, las sustituciones K326W, K326Y, y E333S proporcionan unión mejorada a la proteína C1q del complemento y CDC mejorada. Finalmente, como se describe en Hinton y otros, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, las sustituciones T250Q, T250E, M428L, y M428F proporcionan unión mejorada a FcRn y mejora de la farmacocinética.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- Debido a que los sitios de unión para FcγRs, C1q, y FcRn residen en la región Fc, las diferencias entre las IgGs en la región Fc probablemente contribuyan a las diferencias en las funciones efectoras mediadas por FcγR y C1q. Es además posible que las modificaciones se puedan hacer en otras regiones no-Fc de una variante Fc, que incluyen por ejemplo las regiones Fab y bisagra de un anticuerpo, o la pareja de fusión Fc de una fusión Fc. Por ejemplo, como se describe en USSN 11/090,981, las regiones Fab y bisagra de un anticuerpo pueden impactar las funciones efectoras tales como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP), y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así se contemplan las modificaciones fuera de la región Fc de una variante Fc de la presente solicitud. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente solicitud pueden comprender una o más modificaciones de aminoácidos en las regiones V_L, C_L, V_H, C_H1, y/o bisagra de un anticuerpo.
- 45
- 50
- Otras modificaciones pueden proporcionar determinantes de unión adicionales o nuevos en una variante Fc, por ejemplo sitios de unión adicionales o nuevos del receptor Fc, por ejemplo como se describe en USSN 60/531,752, presentada 12/22,2003, titulada "Fc variants with novel Fc receptor binding sites". En una modalidad, una variante Fc de un isotipo de anticuerpo puede modificarse de forma tal que se una a un receptor Fc de un isotipo diferente. Esto puede ser particularmente aplicable cuando los sitios de unión Fc para los respectivos receptores Fc no se superponen significativamente. Por ejemplo, los determinantes estructurales de la unión de IgA al FcγRI se pueden modificar a una variante Fc de IgG.
- 55
- 60 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden comprender modificaciones que modulan las propiedades farmacocinéticas in vivo de una variante Fc. Estas incluyen, pero sin limitarse a, modificaciones que mejoran la afinidad por el receptor Fc neonatal FcRn (USSN10/020354; WO2001US0048432; EP2001000997063; US6277375; USSN 09/933497; WO1997US0003321; US6737056; WO2000US0000973; Shields y otros, 2001, J Biol Chem 276(9): 6591-

6604; Zhou y otros, 2003, J Mol Biol., 332: 901-913). Estas incluyen además modificaciones que modifican la afinidad del FcRn en una forma específica al pH. En algunas modalidades, cuando se desea una mejora en la vida media in vivo, se prefieren las modificaciones que mejoran específicamente la afinidad por FcRn a un pH inferior (5.5-6) con relación a un pH superior (7-8) (Hinton y otros, 2004, J Biol Chem 279(8): 6213-6216; Dall' Acqua y otros, 2002 J Immuno 169: 5171-5180; Ghetie y otros, 1997, Nat Biotechnol 15(7), 637-640; WO2003US0033037; WO2004US0011213). Por ejemplo, como se describe en Hinton y otros, 2004, "Engineered Human IgG Antibodies with Longer Serum Half-lives in Primates" J Biol Chem 279(8): 6213-6216, las sustituciones T250Q, T250E, M428L, y M428F proporcionan la unión mejorada a FcRn y mejora de la farmacocinética. Además las modificaciones preferidas son aquellas que mantienen la unión mejorada del Fc silvestre a un pH más bajo en relación a un pH más alto. En modalidades alternativas, donde se desea un aclaramiento rápido in vivo, se prefieren las modificaciones que reducen la afinidad por el FcRn. (US6165745; WO1993US0003895; EP1993000910800; WO1997US0021437; Medesan y otros, 1997, J Immunol 158(5): 2211-2217; Ghetie & Ward, 2000, Annu Rev Immunol 18: 739-766; Martin y otros 2001, Molecular Cell 7: 867-877; Kim y otros 1999, Eur J Immunol 29: 2819-2825). Las variantes preferidas que mejoran FcRn se describen en USSN 60/627,763, presentada el 12 de noviembre de 2004; 60/642,886, presentada el 11 de enero de 2005; 60/649,508, presentada el 2 de febrero de 2005; 60/662,468, presentada el 15 de marzo de 2005, y 60/669,311 presentada el 6 de abril de 2005, titulada "Fc Variants with Altered Binding to FcRn".

Las modificaciones adicionales pueden comprender modificaciones de aminoácidos en donde los residuos en un polipéptido Fc se modifican por el residuo correspondiente en un polipéptido Fc homólogo. Las funciones efectoras tales como ADCC, ADCP, CDC, y vida media en suero difieren significativamente entre las diferentes clases de anticuerpos, que incluyen por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG, e IgM humana (referencias - Michaelsen y otros, 1992, Molecular Immunology 29(3): 319-326). La IgG1 humana es el anticuerpo usado más comúnmente para propósitos terapéuticos, y los estudios de modificación en donde se han construido variantes que muestran la función efectora mejorada se han llevado a cabo predominantemente en este contexto. Como se describe anteriormente, es posible determinar residuos correspondientes o equivalentes en polipéptidos Fc que tienen una homología de secuencia o estructural significativa entre si. De la misma manera, es posible usar tales métodos para modificar adicionales modificaciones de aminoácidos en un polipéptido Fc para proporcionar propiedades adicionales optimizadas, por ejemplo como se describe en USSN 60/621,387, presentada 10/21/2004. En una modalidad, se pueden hacer modificaciones de aminoácidos que remplazan uno o más residuos en un polipéptido Fc de la presente solicitud con uno o más residuos en otro polipéptido Fc homólogo. En una modalidad alterna, se construyen polipéptidos Fc híbridos, de forma tal que una o más regiones de un polipéptido Fc de la presente solicitud se remplazan con las regiones correspondientes de un polipéptido Fc homólogo. Por ejemplo, algunos estudios han explorado variantes IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4 con el fin de investigar los determinantes de las diferencias en las funciones efectoras entre ellas. Ver, por ejemplo Canfield & Morrison, 1991, J Exp Med 173: 1483-1491; Chappel y otros, 1991, Proc Natl Acad Sci USA 88(20): 9036-9040; Chappel y otros, 1993, J Biol Chem 268: 25124-25131; Tao, Canfield, y Morrison, 1991, J Exp Med 173: 1025-1028; Tao y otros, 1993, J Exp Med 178: 661-667; Redpath y otros, 1998, Human Immunology, 59, 720-727.

En una modalidad, las variantes de Fc de la presente solicitud comprenden una o más glicofomas modificadas. Por "glicofomas modificadas" como se usa en la presente se entiende una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una variante Fc, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la variante Fc parental. Las glicofomas modificadas pueden ser útiles para una variedad de propósitos, que incluyen pero sin limitarse a, mejorar o reducir la función efectora. Las glicofomas modificadas pueden generarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica (Umaña y otros, 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies y otros, 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields y otros, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa y otros, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473); (US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1); (Potelligent™ technology [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; tecnología de ingeniería de glicosilación GlycoMAb™ [GLYCART biotechnology AG, Zürich, Suiza]). Muchas de estas técnicas se basan en el control del nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que se unen covalentemente a la región Fc, por ejemplo mediante la expresión de una variante Fc en varios organismos o líneas celulares, modificadas o de cualquier otra manera (por ejemplo, células Lec-13 CHO o células de hibridoma YB2/0 de rata), mediante la regulación de las enzimas involucradas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o mediante la modificación de carbohidrato (s) después que la variante de la Fc se expresa. Las glicofomas modificadas típicamente se refieren al carbohidrato u oligosacárido diferente; así una variante Fc, por ejemplo anticuerpo o fusión de Fc, puede comprender una glicofoma modificada. Alternativamente, la glicofoma modificada puede referirse a la variante de Fc que comprende los diferentes carbohidratos u oligosacáridos.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas que no se relacionan específicamente a la función efectora per se. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácido, o pueden ser modificaciones que se hacen enzimáticamente o químicamente. Dicha(s) modificación(es) probablemente proporcionan alguna mejora en la variante de la Fc, por ejemplo, una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. La presente solicitud contempla una variedad de mejoras que se pueden hacer por el acoplamiento de las variantes de Fc de la presente invención con modificaciones adicionales.

En una modalidad preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden comprender modificaciones para reducir la inmunogenicidad en humanos. En una modalidad preferida, la inmunogenicidad de una variante de la Fc de la presente solicitud se reduce mediante el uso de un método descrito en USSN 11/004,590, presentada el 3 de diciembre de 2004, titulada "Methods of Generating Variant Proteins with Increased Host String Content and Compositions Thereof". En modalidades alternas, los anticuerpos de la presente solicitud son humanizados (Clark, 2000, *Immunol Today* 21:397-402). Por anticuerpo "humanizado" como se usa en la presente se entiende un anticuerpo que comprende una región marco (FR) humana y una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR's) de un anticuerpo no-humano (usualmente ratón o rata). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se llama el "donador" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se llama el "aceptor". La humanización se basa principalmente en el injerto de los CDRs del donante en los marcos V_L y V_H del aceptor (humanos) (Winter US 5225539). Esta estrategia se refiere como "injerto de CDR". "Retromutación" de los residuos del marco aceptor seleccionados para los residuos donantes correspondientes a menudo se requiere para recuperar la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213). El anticuerpo humanizado óptimamente además comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente de una inmunoglobulina humana y así típicamente comprenderá una región Fc humana. En la técnica es bien conocida una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reformar anticuerpos no humanos. (Vea Tsurushita & Vasquez, 2004, *La humanización de Monoclonal Antibodies*, Molecular Biology de B Cells, 533-545, Elsevier Science (Estados Unidos), y referencias citadas en él). Los métodos de humanización incluyen, pero sin limitarse a, los métodos descritos en Junos y otros, 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann y otros, 1988; *Nature* 332:323-329; Verhoeyen y otros, 1988, *Science*, 239:1534-1536; Queen y otros, 1989, *Proc Natl Acad Sci, USA* 86:10029-33; He y otros, 1998, *J Immunol* 160: 1029-1035; Carter y otros, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4285-9, Presta y otros, 1997, *Cancer Res* 57(20):4593-9; Gorman y otros, 1991, *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4181-4185; O'Connor y otros, 1998, *Protein Eng* 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de los anticuerpos no humanos puede incluir métodos de revestimiento, como se describe, por ejemplo, en Roguska y otros, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:969-973. En una modalidad, se pueden emplear métodos basados en la selección para humanizar y/o madurar la afinidad de las regiones variable de un anticuerpo, que incluyen pero sin limitarse a métodos descritos en Wu y otros, 1999, *J. Mol. Biol.* 294:151-162; Baca y otros, 1997, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-10684; Rosok y otros, 1996, *J. Biol. Chem.* 271(37): 22611-22618; Rader y otros, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8910-8915; Krauss y otros, 2003, *Protein Engineering* 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto de sólo partes de las CDR, que incluyen pero sin limitarse a los métodos descritos en USSN 09/810,502; Tan y otros, 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; De Pascalis y otros, 2002, *J. Immunol.* 169:3076-3084. Los métodos basados en estructura pueden emplearse para la humanización y la maduración de la afinidad, como por ejemplo se describe en la USSN 10/153,159 y las solicitudes relacionadas.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia parental a las proteínas del MHC. Por ejemplo, modificaciones de aminoácidos podrían diseñarse mediante ingeniería genética de tal manera que no hay ni un número mínimo de epítopos inmunitarios que se predice se unirán, con alta afinidad, a cualquiera de los alelos MHC prevalentes. Varios métodos de identificación de epítopos de unión a MHC en las secuencias de proteínas son conocidos en la técnica y pueden usarse para anotar epítopos en una variante de la Fc de la presente invención. Ver, por ejemplo, WO 98/52976; WO 02/079232; WO 00/3317; USSN 09/903,378; USSN 10/039,170; USSN 60/222,697; USSN 10/339788; PCT WO 01/21823; y PCT WO 02/00165; Mallios, 1999, *Bioinformatics* 15: 432-439; Mallios, 2001, *Bioinformatics* 17: 942-948; Sturniolo y otros, 1999, *Nature Biotech.* 17: 555-561; WO 98/59244; WO 02/069232; WO 02/77187; Marshall y otros, 1995, *J. Immunol.* 154: 5927-5933; y Hammer y otros, 1994, *J. Exp. Med.* 180: 2353-2358. La información basada en la secuencia puede usarse para determinar una puntuación de unión para una interacción péptido - MHC dada (ver, por ejemplo, Mallios, 1999, *Bioinformatics* 15: 432-439; Mallios, 2001, *Bioinformatics* 17: p942-948; Sturniolo y otros, 1999, *Nature Biotech.* 17: 555-561). Es posible usar métodos basados en la estructura en los cuales un péptido dado se coloca computacionalmente en la hendidura para el péptido de una molécula de MHC dada y se determina la energía de interacción (por ejemplo, ver documento WO 98/59244 y documento WO 02/069232). Tales métodos pueden referirse como métodos de "enhebrado". Alternativamente, se pueden usar métodos puramente experimentales; por ejemplo un conjunto de péptidos superpuestos derivados de la proteína de interés pueden probarse experimentalmente para la habilidad de inducir la activación de células T y/u otros aspectos de una respuesta inmune. (ver por ejemplo documento WO 02/77187). En una modalidad preferida, la puntuación de propensión de unión al MHC se calcula para cada marco de 9 residuos a todo lo largo de la secuencia de proteína mediante el uso de un método de matriz (ver Sturniolo y otros, *supra*; Marshall y otros, 1995, *J. Immunol.* 154: 5927-5933, y Hammer y otros, 1994, *J. Exp. Med.* 180: 2353-2358). Es además posible considerar puntuaciones para solamente un subconjunto de estos residuos, o considerar además las identidades de los residuos de péptidos antes y después del marco de 9 residuos de interés. La matriz comprende puntuaciones de unión para aminoácidos específicos que interactúan con el bolsillo de unión al péptido en diferentes moléculas de MHC de clase II humanas. En la modalidad preferida, las puntuaciones en la matriz se obtienen a partir de estudios de unión de péptidos experimentales. En una modalidad preferida alternativa, las puntuaciones para un aminoácido dado que se une a un bolsillo dado se extrapolan de alelos caracterizados experimentalmente a alelos adicionales con alineación de residuos idéntica o similar al bolsillo. Las matrices que se producen por extrapolación se refieren

como "matrices virtuales". En una modalidad alterna, las modificaciones adicionales de aminoácidos pueden modificarse para reducir la propensión de la molécula intacta a interactuar con los receptores de células B y anticuerpos circulantes.

5 Los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente solicitud pueden comprender modificaciones de aminoácidos en una o más regiones fuera de la región Fc, por ejemplo la región Fab del anticuerpo o la pareja de fusión Fc, que proporcionan propiedades óptimas. En una modalidad, la región variable de un anticuerpo de la presente solicitud puede madurarse por afinidad, es decir que se han hecho modificaciones de aminoácidos en los dominios V_H y/o V_L del anticuerpo para mejorar la unión del anticuerpo a su antígeno objetivo. Del mismo modo, se pueden hacer modificaciones en la pareja de fusión Fc para mejorar la afinidad de la fusión Fc por su antígeno objetivo. Tales tipos de modificaciones pueden mejorar la asociación y/o la cinética de disociación para la unión al antígeno objetivo. Otras modificaciones incluyen las que mejoran la selectividad para el antígeno objetivo contra objetivos alternativos. Estas incluyen modificaciones que mejoran la selectividad para el antígeno expresado en el objetivo contra las células no objetivo. Otras mejoras en las propiedades de reconocimiento del objetivo pueden ser proporcionadas por modificaciones adicionales. Tales propiedades pueden incluir, pero sin limitarse a, propiedades cinéticas específicas (es decir cinéticas de asociación y disociación), la selectividad para el objetivo particular contra objetivos alternativos, y la selectividad para una forma específica de objetivo frente formas alternativas. Los ejemplos incluyen variantes de longitud-completa contra variantes de empalme, formas aberrantes de los antígenos que se expresan solamente sobre ciertos tipos de células tales como células tumorales, formas de la superficie celular contra solubles, selectividad por varias variantes polimórficas, o selectividad por formas conformacionales específicas del objetivo.

20 Las variantes de Fc de la solicitud pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan la internalización reducida o mejorada de una variante de Fc. En una modalidad, las variantes de Fc de la presente solicitud se pueden usar o combinar con modificaciones adicionales con el fin de reducir la internalización celular de una variante de Fc que ocurre a través de la interacción con uno o más ligandos de Fc. Esta propiedad puede esperarse que mejore la función efectora, y potencialmente reduzca la inmunogenicidad de las variantes de Fc de la invención. Alternativamente, las variantes de Fc de la presente solicitud se pueden usar directamente o combinarse con modificaciones adicionales con el fin de mejorar la internalización celular de una variante de Fc que ocurre a través de la interacción con uno o más ligandos de Fc. Por ejemplo, en una modalidad preferida, se usa una variante de Fc que proporciona una unión mejorada al FcγRI, que se expresa sobre las células dendríticas y se activa temprano en la respuesta inmune. Esta estrategia puede mejorarse aun más por la combinación con modificaciones adicionales, ya sea dentro de la variante de Fc o en una pareja de fusión o conjugado unida, que promueve el reconocimiento y la presentación de fragmentos de péptidos Fc por moléculas MHC. Estas estrategias se espera que mejoren el procesamiento del antígeno objetivo y así mejoren la antigenicidad del antígeno objetivo (Bonnerot y Amigorena, 1999, Immunol Rev. 172:279-84), promoviendo una respuesta inmune adaptativa y una muerte mayor de la célula objetivo por el sistema inmune humano. Estas estrategias pueden ser particularmente ventajosas cuando el antígeno objetivo se desprende de la superficie celular. Una aplicación adicional de estos conceptos surge con las inmunoterapias de vacunas idiotípicas, en las que anticuerpos clono-específicos producidos por las células de linfoma de un paciente se usan para vacunar al paciente.

40 En una modalidad preferida, las modificaciones se hacen para mejorar las propiedades biofísicas de las variantes de Fc de la presente solicitud que incluyen pero sin limitarse a estabilidad, solubilidad, y estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, las sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la variante de Fc tales como para proporcionar una mayor estabilidad, o la sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares para mayor solubilidad. Un número de objetivos y métodos de optimización se describen en USSN 10/379,392 que pueden encontrar uso para modificar adicionales modificaciones para optimizar más aun las variantes de Fc de la presente solicitud. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden además combinarse con modificaciones adicionales que reducen el estado oligomérico o la talla, de forma tal que mejoran la penetración en el tumor, o aumentan las velocidades de aclaramiento in vivo como se desea.

50 Otras modificaciones a las variantes de Fc de la presente solicitud incluyen aquellas que permiten la formación específica de moléculas homodiméricas u homomultiméricas. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a disulfuros diseñados, así como también modificaciones químicas o métodos de agregación que pueden proporcionar un mecanismo para generar homodiméricos o homomultímeros covalentes. Por ejemplo, los métodos de modificación y composiciones de esas moléculas se describen en Kan y otros, 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson y otros, 2002, Recent Results Cancer Res. 159: 104-12; US 5,681,566; Caron y otros, 1992, J Exp Med 176:1191-1195, y Shopes, 1992, J Immunol 148(9):2918-22. Las modificaciones adicionales para las variantes de la presente solicitud incluyen las que permiten la formación específica de moléculas heterodiméricas, heteromultiméricas, bifuncionales, y/o multifuncionales. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitarse a, una o más sustituciones de aminoácidos en el dominio C_{H3} en el que las sustituciones reducen la formación de homodímero y aumentan la formación de heterodímeros. Por ejemplo, los métodos de modificación y composiciones de esas moléculas se describen en Atwell y otros, 1997, J Mol Biol 270(1):26-35, y Carter y otros, 2001, J Immunol Methods 248:7-15. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones en los dominios bisagra y CH₃, en los que las modificaciones reducen la propensión a formar dímeros.

En modalidades adicionales, las variantes de Fc de la presente solicitud comprenden modificaciones que eliminan los sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, sitios de proteasas que reducen los rendimientos de producción, así como sitios de proteasas que degradan la proteína administrada in vivo. En una modalidad preferida, se hacen modificaciones adicionales para eliminar los sitios de degradación covalente tales como desamidación (es decir desamidación de residuos de glutaminil y asparaginil a los correspondientes residuos glutamil y aspartil), oxidación, y sitios de degradación proteolítica. Sitios de desamidación que son especialmente útiles de eliminar son aquellos que tienen propensión mejorada a la desamidación, que incluyen, pero sin limitarse a asparaginilo y residuos glutamil seguido por glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En tales casos, la sustitución de cualquiera de los residuos puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Sitios de oxidación comunes incluyen residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que pueden bien ser introducidas o eliminadas, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los "grupos aminos de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure y Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Modificaciones adicionales además pueden incluir pero sin limitarse a modificaciones post-traduccionales tales como glicosilación y fosforilación con enlace N o con enlace O.

Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran los rendimientos de la expresión y/o purificación de los huéspedes o células huésped usadas comúnmente para la producción de biológicos. Estos incluyen, pero sin limitarse a diversas líneas celulares de mamíferos (por ejemplo, CHO), líneas celulares de levadura, líneas celulares bacterianas, y plantas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro entre cadenas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracatenarios.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados mediante el uso de, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colaboradores, que incluyen, pero sin limitarse a, los métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson y otros, 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2):7566-71, Zhang y otros, 2003, 303(5656):371-3, y Chin y otros, 2003, Science 301(5635):964-7. En algunas modalidades, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades, funcionales, inmunológicas, biofísicas o de fabricación discutidas anteriormente. En modalidades adicionales, estas modificaciones permiten la modificación química adicional para otros propósitos. Otras modificaciones se contemplan en la presente. Por ejemplo, la variante de Fc puede unirse a una de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Las modificaciones adicionales de aminoácidos pueden incluirse para permitir la modificación química específica o no específica o postraduccionales de las variantes de Fc. Dichas modificaciones, incluyen, pero sin limitarse a PEGilación y glicosilación. sustituciones específicas que pueden utilizarse para permitir la PEGilación incluyen, pero sin limitarse a, la introducción de nuevos residuos de cisteína o aminoácidos no naturales de manera que químicas de acoplamiento eficientes y específicas pueden usarse para conectar un PEG o un resto polimérico de cualquier otra manera. La introducción de sitios de glicosilación específicos se puede lograr por la introducción de nuevas secuencias N-X-T/S dentro de las variantes de Fc de la presente solicitud.

Las variantes de Fc de la presente solicitud se pueden fundir o conjugar a una o más de otras moléculas o polipéptidos. Las parejas conjugadas y de fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de moléculas pequeñas y polipéptidos. Por ejemplo, una variedad de conjugados de anticuerpos y los métodos se describen en Trail y otros, 1999, Curr. Opin. Immunol. 11:584-588. Posibles parejas conjugadas incluyen, pero sin limitarse a las citocinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas modalidades, las parejas conjugadas pueden considerarse más como cargas útiles, es decir que el objetivo de un conjugado es el suministro dirigido de la pareja conjugada a una célula objetivo, por ejemplo una célula cancerosa o célula inmune, por la variante de Fc. Así, por ejemplo, la conjugación de una toxina a un anticuerpo o fusión Fc dirige el suministro de dicha toxina a células que expresan el antígeno objetivo.

En una modalidad, las variantes de la Fc de la presente solicitud se fusionan o conjugan a una citocina. Por "citocina" como se usa en la presente se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet y otros, 2001, J Immunol Methods 248:91-101, las citocinas pueden fusionarse al anticuerpo para proporcionar una matriz de propiedades deseables. Ejemplos de dichas citocinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas incluidas están la hormona de crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionil, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógenogamma placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina beta; activina; factor de crecimiento endotelial

vascular; integrinas; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento del nervio tales como el NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF beta; factor de crecimiento I y II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos, interferones tales como el interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF) y granulocitos-CSF (G-CSF), interleucinas (IL), como la IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, factor de necrosis tumoral como el TNF-alfa o TNF-beta ; -15 ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

En una modalidad alterna, los polipéptidos Fc de la presente solicitud se funden, conjugan, o enlazan operacionalmente a una toxina, que incluyen pero sin limitarse a toxinas pequeñas molécula y toxinas enzimáticamente activas de bacterias, fúngicas, de planta o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de estos. Por ejemplo, una variedad de inmunotoxinas y los métodos de inmunotoxina se describen en Thrush y otros, 1996, Ann. Rev. Immunol. 14:49-71. Las toxinas de moléculas pequeñas incluyen pero sin limitarse a calicheamicina, maitansina (US 5,208,020), tricoteno, y CC1065. En una modalidad de la invención, el polipéptido Fc se conjuga a una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede, por ejemplo, convertirse a May-SS-Me que se puede reducir a May-SH3 y reaccionar con polipéptido Fc modificado (Chari y otros, 1992, Cancer Research 52: 127-131) para generar un conjugado maitansinoide-anticuerpo o maitansinoide-fusión Fc . Otro conjugado de interés comprende un polipéptido Fc, por ejemplo un anticuerpo o fusión de Fc, conjugado a una o más moléculas de calicheamicina . Los antibióticos de la familia calicheamicina son capaces de producir roturas en el ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de la calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitarse a, γ_1^1 , α_2^1 , α_3 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y Θ^1_1 , (Hinman y otros, 1993, Cancer Research 53:3336-3342; Lode y otros, 1998, Cancer Research 58:2925-2928) (US 5,714,586; US 5,712,374; US 5,264,586; US 5,773,001). 10 análogos de Dolastatina tales como auristatina E (AE) y monometilauristatinaE (MMAE) pueden encontrar uso como conjugados para las variantes de Fc de la presente solicitud (Doronina y otros, 2003, Nat Biotechnol 21(7):778-84; Francisco y otros, 2003 Blood 102(4):1458-65). Las toxinas enzimáticamente activas útiles incluyen pero sin limitarse a la cadena A de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii , proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, PCT WO 93/21232.La presente solicitud contempla además un conjugado entre una variante de Fc de la presente invención y un compuesto con actividad nucleolítica, por ejemplo, una ribonucleasa o ADN endonucleasa tal como una desoxirribonucleasa (ADNasa).

En una modalidad alterna, una variante de Fc de la presente solicitud se puede fundir, conjugar, o enlazar operacionalmente a un radioisótopo para formar un radioconjugado. Una variedad de isótopos radioactivos están disponibles para la producción de anticuerpos y fusiones de Fc radioconjugados. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radioactivos de Lu. Ver, por ejemplo, la referencia.

En aún otra modalidad, una variante de Fc de la presente solicitud puede conjugarse a un "receptor" (por ejemplo, estreptavidina) para su utilización en predireccionamiento tumoral en donde el conjugado variante de Fc-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado sin enlazar de la circulación mediante el uso de un agente aclarante y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) la cual se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúclido). En una modalidad alterna, la variante de Fc se conjuga o se une operativamente a una enzima con el fin de emplear Terapia de Profármaco Dependiente de Anticuerpo mediada por enzimas (ADEPT). ADEPT se puede usar por la conjugación o enlace operacional de la variante de Fc a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico peptidil, ver PCT WO 81/01145) en un fármaco anticáncer activo. Ver, por ejemplo, PCT WO 88/07378 y US 4,975,278. El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco en forma tal que lo convierte en su forma más activa, citotóxica. Las enzimas que son útiles en el método incluyen pero sin limitarse a fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracil; proteasas, tales como proteasa serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen D-amino ácido sustituyentes; enzimas que escinden carbohidratos tales como .beta.-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con .alfa.-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, anticuerpos con actividad enzimática, además conocidos en la

técnica como "acizimas", se pueden usar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (ver, por ejemplo, Massey, 1987, Nature 328: 457-458). Los conjugados variante de Fc-acizima se pueden preparar para suministrar el acizima a una población de células tumorales. Una variedad de conjugados adicionales se contemplan para las variantes de Fc de la presente solicitud. Una variedad de agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, inhibidores de tirosina quinasa, y otros agentes terapéuticos se describen más abajo, que pueden encontrar uso como conjugados de variantes de Fc.

Además se contemplan como parejas de fusión y conjugado polipéptidos Fc. Así una variante de Fc puede ser un polipéptido Fc multimérico, que comprende una o más regiones Fc. La ventaja de tal molécula es que proporciona múltiples sitios de unión para receptores Fc con una molécula de proteína única. En una modalidad, las regiones Fc pueden unirse mediante el uso del enfoque de la ingeniería química. Por ejemplo, Fab's y Fc's pueden enlazarse por enlaces tioéter que se originan en los residuos de cisteína en las bisagras, y generan moléculas tales como FabFc₂ (Kan y otros, 2001, J. Immunol., 2001, 166: 1320-1326; Stevenson y otros, 2002, Recent Results Cancer Res. 159: 104-12; US 5,681,566). Las regiones Fc pueden enlazarse mediante el uso de modificación bisulfuro y/o reticulación química, por ejemplo como se describe en Caron y otros, 1992, J. Exp. Med. 176:1191-1195, y Shopes, 1992, J. Immunol. 148(9):2918-22. En una modalidad preferida, las regiones pueden unirse genéticamente. Por ejemplo múltiples dominios C_γ2 se funden entre las regiones Fab y Fc de un anticuerpo (White y otros, 2001, Protein Expression and Purification 21: 446-455). En una modalidad preferida, las regiones Fc en una variante de Fc se unen genéticamente para generar regiones Fc unidas colocadas una detrás de la otra como se describe en USSN 60/531,752, presentada 12/22/2003, titulada "polipéptidos Fc con nuevos sitios de unión al receptor Fc". Los polipéptidos Fc unidos uno detrás del otro pueden comprender dos o más regiones Fc, preferentemente una a tres, con la máxima preferencia dos regiones Fc. Quizás sea ventajoso explorar un número de construcciones modificadas con el fin de obtener variantes de Fc homo- o hetero- unidas una detrás de la otra con las propiedades estructurales y funcionales más favorables. Las variantes de Fc unidas una detrás de la otra pueden ser variantes de Fc homo unidas una detrás de la otra, o sea una variante de Fc de un isotipo se fusiona genéticamente a otra variante de la Fc del mismo isotipo. Se anticipa que porque hay múltiples Fc_γR, C1q y/o sitios de unión Fc_{Rn} sobre polipéptidos Fc unidos uno detrás del otro, las funciones efectoras y/o farmacocinéticas pueden mejorarse. En una modalidad alterna, las variantes de Fc de diferente isotipos se pueden unir en tándem, referidas como variantes de Fc unidas en heterotándem. Por ejemplo, debido a la capacidad de dirigirse a los receptores Fc_γR y Fc_αR, una variante de Fc que une Fc_γR y Fc_αR puede proporcionar una ventaja clínica significativa.

Como se apreciará por un experto en la técnica, en realidad los conceptos y las definiciones de fusión y conjugado se superponen. La designación de una variante de Fc como una fusión o conjugado no pretende restringirla a ninguna modalidad particular de la presente invención. Más bien, estos términos se usan libremente para transmitir el concepto amplio de que cualquier variante de Fc de la presente invención puede estar relacionada genéticamente, químicamente, o de cualquier otra manera, a uno o más polipéptidos o moléculas para proporcionar alguna propiedad deseable.

Las parejas de fusión y conjugado pueden unirse a cualquier región de una variante de Fc de la presente solicitud, lo que incluyen en los N- o C- terminales, o en algún residuo entre los extremos. En una modalidad preferida, una pareja de fusión o conjugado se une a los N- o C-terminales de la variante de Fc, con la máxima preferencia al N-terminal. Una variedad de enlazadores pueden encontrar uso en la presente invención para unir covalentemente las variantes de Fc a una pareja de fusión o conjugado o generar una fusión de Fc. Por "enlazador", "secuencia enlazadora", "separador", "secuencia de inmovilización" o equivalentes gramaticales de estos, en la presente descripción se entiende una molécula o grupo de moléculas (tal como un monómero o polímero) que conecta dos moléculas y frecuentemente sirve para poner las dos moléculas en una configuración preferida. Pueden usarse un número de estrategias para unir covalentemente moléculas entre sí. Estas incluyen, pero sin limitarse a las uniones de polipéptidos entre N- y C-terminales de proteínas o dominios de proteínas, la unión a través de enlaces disulfuro, y la unión a través de reactivos de químicos de reticulación. En un aspecto de esta modalidad el enlazador es un enlace peptídico, generado por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. Seleccionar un enlazador adecuado para un caso específico donde dos cadenas de polipéptidos se van a conectar depende de varios parámetros, que incluyen pero sin limitarse a la naturaleza de las dos cadenas de polipéptidos (por ejemplo, si ellas oligomerizan naturalmente), la distancia entre el N- y el C-terminal que se van a conectar si se conoce, y/o la estabilidad del enlazador hacia la proteólisis y la oxidación. Además, el enlazador puede contener residuos de aminoácidos que proporcionan flexibilidad. Así, el péptido enlazador puede predominantemente incluir los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas en tal forma que asuman la conformación correcta relativa una a la otra de manera que mantengan la actividad deseada. Las longitudes adecuadas para este propósito incluyen al menos uno y no más de 50 residuos de aminoácidos. Preferentemente, el enlazador es desde aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud, con enlazadores de 1 a 20 aminoácidos en longitud que son los más preferidos. Adicionalmente, los residuos de aminoácido seleccionados para la inclusión en el péptido enlazador deben exhibir propiedades que no interfieran significativamente con la actividad del polipéptido. Así, el péptido enlazador como un todo no debe exhibir una carga que sea inconsistente con la actividad del polipéptido, o interferir con el plegado interno, o formar enlaces u otras interacciones con residuos de aminoácidos en uno o más de los monómeros que pudieran impedir seriamente la unión de los dominios monómeros del receptor. Los enlazadores útiles incluyen

5 polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n, (GGGGS)_n, y (GGGS)_n, donde n es un entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles, tales como el enlace para el canal de potasio con agitador, y una gran variedad de otros enlazadores flexibles, como será apreciado por los expertos en la técnica. Los polímeros de glicina-serina se prefieren ya que ambos aminoácidos son relativamente no estructurados, y por lo tanto pueden ser capaces de servir como un enlace neutral entre componentes. Secundariamente, la serina es hidrofílica y por lo tanto capaz de solubilizar lo que podría ser una cadena globular de lisina. Tercero, cadenas similares mostraron ser efectivas en unir subunidades de proteínas recombinantes tales como anticuerpos de cadena simple. Los enlazadores adecuados además pueden identificarse por el tamizaje de bases de datos de estructuras tridimensionales conocidas para motivos de origen natural que pueden cerrar la brecha entre dos cadenas de polipéptidos. En una modalidad preferida, el enlazador no es inmunogénico cuando se administra en un paciente humano. Así los enlazadores pueden seleccionarse de manera tal que tengan baja inmunogenicidad o se piense que tengan baja inmunogenicidad. Por ejemplo, se puede seleccionar un enlazador que exista naturalmente en un humano. En una modalidad más preferida, el enlazador tiene la secuencia de la región bisagra de un anticuerpo, que es la secuencia que enlaza las regiones Fab y Fc del anticuerpo; alternativamente el enlazador tiene una secuencia que comprende parte de la región bisagra, o una secuencia que es sustancialmente similar a la región bisagra de un anticuerpo. Otra manera de obtener un enlazador adecuado es por la optimización de un enlazador simple, por ejemplo, (Gly4Ser)_n, mediante mutagénesis aleatoria. Alternativamente, una vez que se define un polipéptido enlazador adecuado, se pueden crear polipéptidos enlazadores adicionales para seleccionar los aminoácidos que interactúan más óptimamente con los dominios que se unen. Otros tipos de enlazadores que se pueden usar en la presente invención incluyen polipéptidos enlazadores e inteínas artificiales. En otra modalidad, se diseñan enlaces disulfuro para unir las dos moléculas. En otra modalidad, los enlazadores son agentes químicos de reticulación. Por ejemplo, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional, que incluyen pero sin limitarse a N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como tolueno 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y otros, 1971, Science 238:1098. Los enlazadores químicos pueden permitir la quelación de un isótopo. Por ejemplo, el ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminepentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un quelante ilustrativo para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo (ver PCT WO 94/11026). El enlazador puede ser escindible, facilitar la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil al ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador dimetil o enlazador que contiene disulfuro (Chari y otros, 1992, Cancer Research 52: 127-131). Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, que incluyen pero sin limitarse a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores, o sea, pueden encontrar uso para enlazar las variantes de Fc de la presente solicitud a una pareja de fusión o conjugado para generar una fusión Fc, o enlazar las variantes de Fc de la presente solicitud a un conjugado.

40 Métodos de modificación

Diseñar estrategias, métodos de selección computacionales, y métodos de generación de biblioteca se describen en USSN 10/672,280 y USSN 10/822,231, titulada "Optimized Fc Variants and Methods for their Generation". Estas estrategias, enfoques, técnicas y métodos se pueden aplicar individualmente o en varias combinaciones para generar variantes de Fc optimizadas.

45 Producción experimental de las variantes de Fc

50 La presente invención proporciona métodos para producir y probar experimentalmente variantes de la Fc. Los métodos descritos no se destinan a limitar la presente invención a cualquier aplicación o teoría de operación particular. Más bien, los métodos proporcionados están destinados a ilustrar generalmente que una o más variantes de Fc pueden ser producidas y probadas experimentalmente para obtener variantes de variantes de Fc. Los métodos generales para biología molecular, expresión, purificación y detección de anticuerpos se describen en Antibody Engineering, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76; anticuerpos: A Laboratory Manual by Harlow & Lane, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988.

60 En una modalidad de la presente invención, se crean ácidos nucleicos que codifican las variantes de Fc, y que pueden clonarse después en células huésped, expresadas y ensayadas, si se desea. Así, los ácidos nucleicos, y en particular ADN, pueden hacerse para que codifiquen cada secuencia de la proteína. Estas prácticas se llevan a cabo mediante el uso de procedimientos conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la presente invención se describen en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ra Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Como se apreciará por los experimentados en la técnica, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un gran número

de secuencias es potencialmente costoso y consume tiempo. En consecuencia, hay una variedad de técnicas que pueden usarse para generar eficientemente las bibliotecas. Tales métodos que pueden encontrar uso en la presente invención se describen o se mencionan en US 6,403,312; USSN 09/782,004; USSN 09/927,790; USSN 10/218,102; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. Tales métodos incluyen, pero sin limitarse a métodos de ensamble de genes, métodos basados en la PCR y los métodos que usan variaciones de la PCR, los métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, métodos de combinados de oligo tales como los usados en combinación aleatoria sintética, métodos de amplificación propensos a errores y métodos que usan oligos con mutaciones al azar, métodos clásicos de mutagénesis dirigida, mutagénesis de casete, y otros métodos de amplificación y síntesis de genes. Como es conocido en la técnica, hay una variedad de kits comercialmente disponibles y métodos para el ensamble de genes, mutagénesis, vectores de subclonación, y similares, y tales productos comerciales encuentran uso en la presente invención para generar ácidos nucleicos que codifican las variantes de la Fc.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden producirse por cultivo de una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferentemente un vector de expresión, que contiene un ácido nucleico que codifica las variantes de Fc, en las condiciones adecuadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Las condiciones adecuadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y será fácilmente comprobada por un experto en la técnica a través de experimentación de rutina. Una amplia variedad de células huésped adecuadas puede usarse, que incluye pero sin limitarse a células de mamíferos, bacterias, células de insectos y de levadura. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la presente invención se describen en el catálogo de líneas celulares ATCC®, disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo.

En una modalidad preferida, las variantes de Fc se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, que incluyen sistemas en los que se introducen las construcciones de expresión en las células de mamífero mediante el uso de virus tales como retrovirus o adenovirus. Se puede usar cualquier célula de mamíferos, y se prefieren particularmente las células de humanos, ratón, rata, hámster, y primates. Las células adecuadas incluyen además células de investigación conocidas, que incluyen, pero sin limitarse a células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NS0 y variantes de estos. En una modalidad preferida alternativamente, las proteínas de la biblioteca se expresan en células bacterianas. Sistemas de expresión bacterianos son bien conocidos en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*. En modalidades alternas, variantes de Fc se producen en células de insecto (por ejemplo, Sf21/Sf9, Trichoplusia ni Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). En una modalidad alterna, las variantes de Fc se expresan *in vitro* mediante el uso de sistemas de traducción libres de células. Los sistemas de traducción *in vitro* derivados de ambas células procarionta (por ejemplo *E. coli*) y eucariota (por ejemplo germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y se pueden seleccionar en base a los niveles de expresión y propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los expertos en la técnica, la traducción, *In vitro* es necesaria para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación de ribosomas. Adicionalmente, las variantes de Fc pueden producirse por métodos de síntesis química. También los sistemas de expresión transgénicos tanto animal (por ejemplo leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insectos completas, etc) y de planta (por ejemplo, maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.)

Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de Fc pueden ser incorporados en un vector de expresión con el fin de expresar la proteína. Una variedad de vectores de expresión puede usarse para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores autorreplicantes extracromosómicos o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula huésped. Así, los vectores de expresión que encuentran uso en la presente invención incluyen, pero sin limitarse a, los que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insecto, de levadura, y en sistemas *in vitro*. Como es conocido en la técnica, una variedad de vectores de expresión está disponible comercialmente o de cualquier otra manera, que pueden encontrar uso presente invención para expresar variantes de la Fc.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente con las secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en la presente se entiende que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional unido operativamente al ácido nucleico que codifica la variante de Fc, y son típicamente adecuados para la célula huésped usada para expresar la proteína. Generalmente, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosomal secuencias de inicio y de terminación de la transcripción secuencias de inicio y de terminación de la traducción, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como además se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen de selección o marcador para permitir la selección de células huéspedes transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

Las variantes de Fc pueden estar unidas operativamente a un pareja de fusión para permitir la orientación de la proteína expresada, purificación, detección, presentación, y similares. Las parejas de fusión pueden unirse a la secuencia de la

variante de Fc a través de secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora comprenderá generalmente un pequeño número de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también pueden usarse enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras son seleccionadas para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como se apreciará por los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede usarse como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un

5 pareja de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o señalización que dirige la variante de Fc y cualquier pareja de fusión asociada a una localización celular deseada o al medio extracelular. Como es conocido en la técnica, ciertas secuencias de señalización pueden dirigirse a una proteína que sea secretada ya sea en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Una pareja de

10 fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o proteína que permite la purificación y/o detección. Tales parejas de fusión incluyen, pero sin limitarse a las etiquetas de polihistidina (HIS-tags) (por ejemplo H₆ y H₁₀ u otras etiquetas para su uso en sistemas de Cromatografía de Afinidad con Metal Inmovilizado (IMAC) (por ejemplo. Ni⁺² columnas de afinidad)), fusiones a GST, fusiones a MBP, Strep-tag, la secuencia objetivo de biotilación BSP de la enzima bacteriana BirA y etiquetas de epítipo que son el objetivo de los anticuerpos (por ejemplo etiquetas c-myc, etiquetas-flag, y similares). Como se apreciará por los expertos en la técnica, tales etiquetas pueden ser útiles para la purificación, para la detección, o ambas cosas. Por ejemplo, una variante de Fc puede purificarse mediante el uso de un

15 His-tag inmovilizándolo a una columna de afinidad de Ni⁺², y, a continuación, después de la purificación la misma His-tag puede usarse para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta de Ni⁺² para llevar a cabo un ELISA u otro ensayo de unión (como se describe más abajo). Un pareja de fusión puede permitir el uso de un método de selección para detectar variantes de Fc (ver más abajo). Las parejas de fusión que permiten una variedad de métodos de selección se conocen bien en la técnica, y todas ellas encuentran uso en la presente invención. Por ejemplo, mediante la fusión de los miembros de una biblioteca de la variante de Fc de la proteína del gen III, puede emplearse presentación en fagos (Kay y otros, Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman y otros, 1991, Biochemistry 30:10832-10838; Smith, 1985, Science 228:1315-1317). Las parejas de fusión pueden permitir

20 que las variantes de Fc se etiqueten. Alternativamente, una pareja de fusión puede unirse a una secuencia específica en el vector de expresión, lo que permite a la pareja de fusión y a la variante de Fc asociada unirse covalentemente o no covalentemente con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, USSN 09/642,574; USSN 10/080,376; USSN 09/792,630; USSN 10/023,208; USSN 09/792,626; USSN 10/082,671; USSN 09/953,351; USSN 10/097,100; USSN 60/366,658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; y PCT WO 02/07466 describen parejas de fusión de este tipo y las técnicas que pueden encontrar uso en la presente invención.

Los métodos de introducción de ácido nucleico exógeno en células huésped son bien conocidos en la técnica, y variarán con la célula huésped usada. Las técnicas incluyen pero sin limitarse a transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección viral o fago, la encapsulación del polinucleótido (s) en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. En el caso de células de mamíferos, la transfección puede ser transitoria o estable.

35

En una modalidad preferida, las variantes de Fc se purifican o aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, que incluyen intercambio iónico, interacción hidrófoba, de afinidad, de tamaño o de filtración en gel, y de fase reversa, llevado a cabo a presión atmosférica o a alta presión mediante el uso de sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación incluyen también técnicas electroforéticas, inmunológicas, precipitación, diálisis, y de cromatofoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, conjuntamente con concentración de proteínas, también son útiles. Como es bien conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se unen a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden encontrar uso en la presente invención para la purificación de las variantes de Fc. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Del mismo modo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como lo hace por supuesto el antígeno objetivo del anticuerpo. La purificación a menudo puede activarse por un pareja de fusión particular. Por ejemplo, las variantes de la Fc pueden purificarse mediante el uso de resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad Ni⁺² si se emplea una His-tag, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se emplea una flag-tag. Para una orientación general en técnicas de purificación adecuadas, ver Protein Purification: Principles and Practice, 3ra Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará dependiendo del tamiz o el uso de las variantes de Fc. En algunos casos no es necesaria purificación. Por ejemplo, en una modalidad, si las variantes de Fc se secretan, el tamiz puede tener lugar directamente desde el medio. Como es bien conocido en la técnica, algunos métodos de selección no involucran la purificación de proteínas. Así, por ejemplo, si una biblioteca de variantes de Fc se realiza en una biblioteca de presentación de fagos, puede no llevarse a cabo la purificación de proteínas.

40

45

50

55

Ensayos Experimentales

60

Las variantes de Fc pueden seleccionarse mediante el uso de una variedad de métodos, que incluyen, pero sin limitarse a los que usan ensayos *in vitro*, *in vivo* y ensayos basados en células, y tecnologías de selección. Tecnologías de automatización y tamizaje de alto rendimiento pueden usarse en los procedimientos de tamizaje. El tamizaje puede

- emplear el uso de un pareja de fusión o etiqueta. El uso de parejas de fusión se ha discutido anteriormente. Por "etiquetado" en la presente se entiende que las variantes de Fc tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un tamiz. En general, las etiquetas se dividen en tres clases: a) las etiquetas inmunes, que puede ser un epítipo incorporado como pareja de fusión que es reconocido por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, que puede ser isótopos radiactivos o pesados, y c) las etiquetas de moléculas pequeñas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como la biotina que permiten a otros métodos de marcaje. Las etiquetas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de la proteína.
- In a modalidad preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las variantes de Fc se tamizan en un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* pueden permitir un amplio intervalo dinámico para la selección de propiedades de interés. Las propiedades de las variantes de Fc que pueden ser seleccionadas incluyen pero sin limitarse a la estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos de Fc, por ejemplo FcγRs. Múltiples propiedades pueden tamizarse simultáneamente o individualmente. Las proteínas pueden ser purificadas o impuras, dependiendo de los requisitos del ensayo. En una modalidad, el tamizaje es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para la unión de las variantes de Fc a una molécula proteica o no proteica que se conoce o se piensa que se une a la variante de Fc. En una modalidad preferida, el tamizaje es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno objetivo. En una modalidad preferida alternativa, la selección es un ensayo para la unión de variantes de Fc a un ligando de Fc, que incluyen pero sin limitarse a la familia de FcγRs, el receptor neonatal FcRn, la proteína C1q del complemento, y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos de Fc, pueden ser de cualquier organismo, pero se prefieren humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los ensayos de unión pueden llevarse a cabo mediante el uso de una variedad de métodos conocidos en la técnica, que incluyen pero sin limitarse a ensayos basados en FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia) y BRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo Amplificado Luminescente Homogéneo de Proximidad), Ensayo de Proximidad de Centelleo, ELISA (Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima), SPR (Resonancia de Plasmón Superficial, también conocido como BiaCore®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel y cromatografía que incluye filtración en gel. Estos y otros métodos pueden tomar ventaja de algunas parejas de fusión o de la etiqueta de la variante de Fc. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, que incluyen pero sin limitarse a etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes, o isotópicas.
- Las propiedades biofísicas de variantes de Fc, por ejemplo, estabilidad y solubilidad, se pueden tamizar mediante el uso de una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de la proteína puede determinarse midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desplegado. Por ejemplo, las variantes de Fc pueden ser desplegadas mediante el uso de química desnaturante, calor, o pH, y esta transición puede controlarse mediante el uso de métodos que incluyan pero sin limitarse a la espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbanza, espectroscopia de NMR, calorimetría, y proteólisis. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos del plegado y las transiciones que se desarrollan también pueden controlarse mediante el uso de estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural global de una variante de Fc pueden determinarse cuantitativamente o cualitativamente mediante el uso de una amplia variedad de métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos que pueden encontrar uso en la presente invención para la caracterización de las propiedades biofísicas de las variantes de Fc incluyen electroforesis en gel, isoelectroenfoque, electroforesis capilar, cromatografía tal como cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa, mapeo de péptidos, oligosacáridos mapeo, espectrometría de masas, espectroscopia de absorbanza ultravioleta, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, ultra-centrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, proteólisis, y reticulación, medición de la turbidez, ensayos de retardo en filtro, ensayos inmunológicos, ensayos fluorescentes de tinte de unión, ensayos de tinción de proteína, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. El análisis estructural empleando técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopia de RMN pueden además encontrar uso. En una modalidad, la estabilidad y/o solubilidad pueden medirse mediante la determinación de la cantidad de solución de proteína después de un periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede o no estar expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo elevada temperatura, bajo pH, o la presencia de desnaturante. Debido a que la función requiere normalmente una proteína estable, soluble, y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión antes mencionados también proporcionan formas de realizar una medición de este tipo. Por ejemplo, una solución que comprende una variante de Fc podría ensayarse por su capacidad para unirse al antígeno objetivo, y después se expone a temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos, y después se ensaya de nuevo para la unión al antígeno. Debido a que no se espera que la proteína desplegada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medida de la estabilidad y la solubilidad de las variantes de Fc.
- En una modalidad preferida, la biblioteca se selecciona mediante el uso de uno o más ensayos basados en célula o *in vitro*. Para tales ensayos, las variantes de Fc, purificadas o no purificadas, se añaden típicamente de forma exógena de tal manera que las células se exponen a variantes individuales o grupos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos están basados típicamente, pero no siempre, en la biología de la capacidad del anticuerpo o la fusión Fc

de unirse al antígeno objetivo y mediar algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo funciones efectoras, como la lisis celular, fagocitosis, inhibición de la unión ligando/receptor, inhibición de crecimiento y/o proliferación, apoptosis y similares. Tales ensayos a menudo involucran el control de la respuesta de las células a la variante de Fc, por ejemplo la supervivencia celular, la muerte celular, fagocitosis celular, lisis celular, el cambio en la morfología celular, o la activación transcripcional tales como la expresión celular de un gen natural o gen reportero. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de Fc para provocar ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, es decir además de las células objetivo, por ejemplo, complemento de suero, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMCs), células NK, macrófagos y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferentemente seres humanos, ratones, rata, conejo, y mono. Los anticuerpos reticulados o monoméricos y fusiones de Fc pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan el antígeno objetivo del anticuerpo, o pueden mediar el ataque en células objetivo por células inmunes que se han añadido al ensayo. Los métodos de control para la muerte celular o la viabilidad son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos fluoróforos, inmunoquímicos, citoquímicos, y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de caspasa o de conjugados de anexina-flúor pueden permitir la medida de la apoptosis, y la absorción o liberación de sustratos radioactivos (por ejemplo, los ensayos de liberación de cromó-51) o reducción metabólica de colorantes fluorescentes tales como azul alamar pueden permitir el control del crecimiento celular, la proliferación o la activación. En una modalidad preferida, se usa el ensayo de citotoxicidad DELFIA® basado en EuTDA (Perkin Elmer, MA). Alternativamente, las células objetivo muertas o dañadas pueden controlarse mediante la medición de la liberación de una o más proteínas intracelulares naturales, por ejemplo lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede controlarse mediante el ensayo de genes naturales o proteínas que pueden ser activadas o reprimidas, por ejemplo se puede medir la liberación de ciertas interleucinas, o alternativamente la lectura puede ser a través de una luciferasa o una construcción reportera GFP. Los ensayos basados en células además pueden involucrar la medida de los cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una variante de Fc. Los tipos de células para tales ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y una variedad de líneas celulares que son conocidas en la técnica pueden ser empleadas. Alternativamente, los tamizajes basados en células se realizaron mediante el uso de células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las variantes de Fc.

Los ensayos in vitro incluyen pero sin limitarse a ensayos de unión, ADCC, CDC, citotoxicidad, proliferación, liberación de peróxido/ozono, quimiotaxis de células efectoras, inhibición de tales ensayos por la función efectora reducida de anticuerpos; intervalo de actividades tales como mejora >100x o reducción >100x, mezclas de activación del receptor y los resultados de ensayo que se esperan de este tipo de perfiles de los receptores.

Experimentos preclínicos y modelos animales

Las propiedades biológicas de las variantes de Fc pueden ser caracterizadas en células, tejidos, y experimentos de organismo entero. Como se conoce en la técnica, los fármacos se prueban a menudo en animales, incluyendo pero sin limitarse a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con el fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra un modelo de enfermedad o enfermedad, o para medir la farmacocinética de un fármaco, toxicidad y otras propiedades. Dichos animales pueden referirse como modelos de enfermedad. Con respecto a las variantes de Fc de la presente solicitud, se plantea un reto particular cuando se usan modelos animales para evaluar la eficacia potencial de los polipéptidos candidatos en pruebas con humanos - esto se debe, al menos en parte, al hecho de que las variantes de Fc que tienen un efecto específico en la afinidad para un receptor de Fc humano pueden no tener un efecto de afinidad similar con el receptor ortólogo de animales. Estos problemas pueden ser exacerbados más aun por las ambigüedades inevitables asociadas con la correcta asignación de los verdaderos ortólogos (Mechetina y otros, *Immunogenetics*, 2002 54:463-468), y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal (por ejemplo, los humanos poseen un FcγRIIa mientras que los ratones no). Los terapéuticos frecuentemente se prueban en ratones, que incluyen pero sin limitarse a ratones desnudos, ratones SCID, ratones xenoinjertados, y ratones transgénicos (que incluyen knockins y knockouts). Por ejemplo, un anticuerpo o fusión Fc de la presente solicitud que se desea como un terapéutico anticáncer se puede probar en un modelo tumoral de ratón, por ejemplo un ratón xenoinjertado. En este método, un tumor o línea celular tumoral se injerta o inyecta en un ratón, y subsecuentemente el ratón se trata con el terapéutico para determinar la habilidad del anticuerpo o fusión de Fc para reducir o inhibir el crecimiento del cáncer y las metástasis. Un enfoque alternativo es el uso del modelo murino SCID en el que ratones inmuno deficientes se inyectan con PBLs humanos, lo que les confiere un sistema inmune semi-funcional y humano, con un conjunto apropiado de FcγRs humanos - a los ratones que subsecuentemente se inyectan con anticuerpos o polipéptidos Fc que se dirigen a las células tumorales humanas inyectadas. En tal modelo, los polipéptidos Fc que se dirigen al antígeno deseado (tales como her2/neu en células de cáncer de ovario SkOV3) interactúan con PBLs humanos dentro de los ratones para participar en funciones efectoras tumorocidas. Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicha variante de Fc para ser usado como agente terapéutico. Cualquier organismo, preferentemente mamíferos, puede usarse para la prueba. Debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por lo tanto se pueden usar para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de los polipéptidos Fc de la presente solicitud. Las pruebas de las variantes de Fc de la presente invención en los seres humanos, se requieren en última instancia

para su aprobación como medicamentos, y por lo tanto, por supuesto, estos experimentos se contemplan. Por lo tanto, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden probarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética, y/u otras propiedades clínicas.

5 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden conferir un desempeño superior en los terapéuticos de los polipéptidos Fc en modelos animales o en humanos. Los perfiles de unión al receptor de tales variantes de Fc, como se describe en esta descripción, puede ser seleccionado, por ejemplo, para aumentar la potencia de los fármacos citotóxicos o para dirigirse a funciones efectoras o células efectoras específicas para mejorar la selectividad de la acción de un fármaco. Más aun, los perfiles de unión al receptor pueden ser seleccionados para que puedan reducir algunas o todas las funciones efectoras, reduciendo así los efectos secundarios o toxicidad de tales fármacos del polipéptido Fc. Por ejemplo, una variante de Fc con unión reducida a FcγRIIIa, FcγRI y FcγRIIa se puede seleccionar para eliminar la mayor función efectora mediada por células, o una variante de Fc con unión reducida a C1q puede ser seleccionada para limitar las funciones efectoras mediadas por el complemento. En algunos contextos, tales funciones efectoras se conoce que tienen efectos citotóxicos potenciales, por lo tanto eliminarlas puede aumentar la seguridad del fármaco del polipéptido Fc, y tal seguridad mejorada se puede caracterizar en modelos animales. En algunos contextos, tales funciones efectoras se conoce que median la actividad terapéutica deseada, por lo tanto mejorarlas puede aumentar la actividad o potencia del fármaco del polipéptido Fc y tal actividad o potencia mejorada se puede caracterizar en modelos animales.

20 Las variantes de Fc optimizadas se pueden probar en una variedad de modelos tumorales ortotópicos. Estos modelos animales clínicamente relevantes son importantes en el estudio de la patofisiología y la terapia de cánceres agresivos como el cáncer pancreático, de próstata y de mama. Los ratones privados de inmunidad que incluyen, pero sin limitarse a ratones desnudos atímicos o SCID se usan frecuentemente para calificar la expansión tumoral local y sistémica desde el sitio de la inyección intraórgano (por ejemplo, páncreas, próstata o glándula mamaria) de las células tumorales humanas o fragmentos de los pacientes donadores.

En modalidades preferidas, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ser evaluados para la eficacia en modelos animales clínicamente relevantes de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos relevantes incluyen varios animales transgénicos para antígenos tumorales específicos. Modelos transgénicos relevantes tales como los que expresan receptores Fc humanos (por ejemplo, FcγRIIIa que incluyen la cadena gamma, FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, y otros) podría ser usado para evaluar y probar la eficacia de los polipéptidos Fc de la presente solicitud. La evaluación de las variantes de Fc por la introducción de genes humanos que median directa o indirectamente la función efectora en ratones u otros roedores, pueden permitir estudios fisiológicos de eficacia en la toxicidad tumoral u otras enfermedades tales como trastornos autoinmunes y RA. Los receptores Fc humanos tales como FcγRIIIa pueden poseer polimorfismos, tal como en la posición 158 (V o F como se describió) lo que permitiría además la introducción de polimorfismos específicos y combinaciones de polimorfismos humanos en roedores. Los diversos estudios que involucran polimorfismo específico de FcRs no se limitan a esta sección, sin embargo, y abarcan todas las discusiones y las aplicaciones de FcγRs en general como se especifica en toda esta solicitud. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden conferir una actividad superior sobre los polipéptidos Fc en tales modelos transgénicos. Particularmente, las variantes con perfiles de unión optimizados para la actividad mediada por el FcγRIIIa humano puede mostrar una actividad superior en ratones transgénicos CD16 (FcγRIII). Mejoras similares en la eficacia en ratones transgénicos para otros receptores de Fc humanos, por ejemplo, FcγRIIa, FcγRI, etc., se puede observar para las variantes de Fc con perfiles de unión optimizados para los respectivos receptores. Los ratones transgénicos para múltiples receptores humanos mostrarían una actividad mejorada para las variantes de Fc con perfiles de unión optimizados para los múltiples receptores correspondientes, por ejemplo como se resume en la Tabla 1.

La introducción de antígenos tumorales objetivo tales como el CD20 humano en células B de roedores en la forma de un modelo de animal transgénico se puede usar para proporcionar una evaluación de la eficacia más relevante. Como tal, el antígeno objetivo no necesita limitarse a una construcción completamente humana pero podría ser una proteína de fusión que contiene el epítipo humano relevante del antígeno objetivo. En una modalidad preferida, la prueba de los polipéptidos Fc puede incluir sistemas modelos transgénicos, que incluyen la combinación de pero sin limitarse a ambos el antígeno objetivo humano y los receptores Fc humanos (por ejemplo para evaluar la eficacia y actividad tumoricida).

In a modalidad preferida, los polipéptidos Fc de la presente solicitud que se dirigen al antígeno Her2 (por ejemplo, variantes de Fc de mu4D5 o sus análogos humanizados) pueden evaluar se para la eficacia en modelo de ratón clínicamente relevante de cáncer de mama. Ejemplos de modelos relevantes incluyen, pero sin limitarse a: 1) los ratones transgénicos HER2/neu (neu-N)-, que se derivan de la cepa de ratón parental FVB/N y son transgénicos para la forma de rata del proto-oncogen HER2/neu (neu); y 2) ratones transgénicos que sobre expresan el HER2 humano bajo el promotor del virus de tumor mamario murino (Finkle y otros, 2004, Clin Cancer Res.10 (7):2499-511). Los polipéptidos Fc de la presente invención que muestran una eficacia superior en estos modelos representan probablemente candidatos para desarrollo adicional.

Debido a las dificultades y ambigüedades asociadas con el uso de modelos animales para caracterizar la eficacia

5 potencial de anticuerpos candidatos terapéuticos en un paciente humano, algunas variantes de polipéptidos de la presente solicitud pueden encontrar utilidad como indicadores para evaluar la eficacia potencial en humanos. Tales moléculas sustitutas preferentemente imitarían, en el sistema animal, la biología del FcγR y/o complemento de una variante de Fc humana candidata correspondiente. Este mimetismo es más probable que se manifieste por afinidades de asociación relativas entre las variantes de Fc específicas y animales frente a los receptores humanos. Por ejemplo, si uno usara un modelo de ratón para evaluar la eficacia potencial en humano de una variante de Fc que tiene una afinidad mejorada por el FcγRIIIa humano, una variante sustituta adecuada tendría una afinidad mejorada por el FcγRIII-2 de ratón (CD16-2 de ratón). Alternativamente si uno usara un modelo de ratón para evaluar la eficacia potencial en humano de una variante de Fc que tiene una afinidad reducida por el receptor inhibitor humano FcγRIIb, una variante sustituta adecuada tendría afinidad reducida por el FcγRII de ratón. Además debe señalarse que las variantes de Fc sustitutas podrían crearse en el contexto de una variante de Fc humana, una variante de Fc animal, o ambos.

15 En una modalidad preferida, las pruebas de variantes de Fc pueden incluir el estudio de eficacia en primates (por ejemplo, modelo de mono cynomolgus) para facilitar la evaluación de la reducción de las células objetivo específicas que albergan el antígeno objetivo. Los modelos de primates adicionales incluyen pero sin limitarse al del mono rhesus y los polipéptidos Fc en los estudios terapéuticos de autoinmunidad, trasplante y cáncer.

20 Se llevan a cabo estudios de toxicidad para determinar los efectos relacionados con el polipéptido Fc que no pueden evaluarse en perfiles farmacológicos estándar o se producen sólo después de la administración repetida del agente. La mayoría de los ensayos de toxicidad se realizan en dos especies - un roedor y un no roedor -para asegurar que cualquier efecto adverso inesperado no se pase por alto antes de que nuevas entidades terapéuticas se introduzcan en los humanos. En general, estos modelos pueden medir una variedad de efectos tóxicos, que incluyen genotoxicidad, toxicidad crónica, inmunogenicidad, toxicidad reproductiva/desarrollo y la carcinogenicidad. Se incluyen dentro de los parámetros antes mencionados están medidas estándares de consumo de alimentos, peso corporal, formación de anticuerpos, química clínica y el examen macro y microscópico de órganos/tejidos normales (por ejemplo, cardiotoxicidad). Los parámetros adicionales de medición son trauma en el sitio de la inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si los hubiere. Tradicionalmente, los agentes terapéuticos de anticuerpo monoclonal, desnudos o conjugados se evalúan para la reactividad cruzada con tejidos normales, la inmunogenicidad/producción de anticuerpos, toxicidad del conjugado, enlazador y toxicidad del "espectador" de especies radioetiquetadas. No obstante, estos estudios pueden tener que ser individualizados para abordar las preocupaciones específicas y siguiendo la orientación establecida por ICH S6 (Estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también señalado anteriormente). Como tal, los principios generales son que los productos están suficientemente bien caracterizados y para los que las impurezas/contaminantes han sido eliminados, que el material de prueba es comparable en todo el desarrollo, y cumplimiento de las GLP.

35 La farmacocinética (PK) de las variantes de Fc de la solicitud puede ser estudiada en una variedad de sistemas de animales, donde el más relevante son los primates no humanos, tales como los monos cynomolgus y rhesus. Administraciones únicas o repetidas i.v./s.c. sobre un intervalo de dosificación de 6000-veces (0.05-300 mg/kg) pueden evaluarse para la vida media (días a semanas) mediante el uso de la concentración y aclaramiento en el plasma como también se pueden medir el volumen de distribución en el estado de equilibrio y el nivel de absorbancia sistémica. Los ejemplos de tales parámetros de medición generalmente incluyen la concentración plasmática máxima observada (C_{max}), el tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}), el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito [AUC (0-inf)] y aparente vida media de eliminación (T_{1/2}). Parámetros medidos adicionales podrían incluir análisis compartimental de los datos de concentración-tiempo obtenidos después de la administración intravenosa y la biodisponibilidad. Ejemplos de estudios farmacológico/toxicológicos mediante el uso de cynomolgus se establecieron para Rituxan y Zevalin en los que los anticuerpos monoclonales para el CD20 tienen reactividad cruzada. Los estudios de biodistribución, dosimetría (para anticuerpos radioetiquetados o fusión de Fcs), y PK pueden además hacerse en modelos de roedores. Tales estudios evaluarían la tolerancia a todas las dosis administradas, toxicidad a los tejidos locales, localización preferencial a modelos animales de xenoinjertos de roedores, reducción de células objetivo (por ejemplo células CD20 positivas).

50 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden conferir farmacocinéticas superiores en los terapéuticos de los polipéptidos Fc en sistemas animales o en humanos. Por ejemplo, una unión aumentada a FcRn puede aumentar la vida media y la exposición del polipéptido Fc. Alternativamente, una unión disminuida a FcRn puede disminuir la vida media y la exposición del polipéptido Fc en casos donde una exposición reducida es favorable, tal como cuando tal fármaco tiene efectos secundarios.

60 Se conoce en la técnica que el conjunto de receptores Fc se expresa diferencialmente en varios tipos de células inmunes, así como también en diferentes tejidos. La distribución diferencial en los tejidos de receptores Fc puede en última instancia tener un impacto en las propiedades farmacodinámicas (PD) y farmacocinéticas (PK) de las variantes de Fc de la presente invención. Debido a que las variantes de Fc de la presente solicitud tienen afinidades variables por el conjunto de receptores Fc, la selección adicional de los polipéptidos para las propiedades PD y/o PK puede ser

extremadamente útil para definir el balance óptimo de PD, PK, y eficacia terapéutica conferida por cada polipéptido candidato.

5 Los estudios de farmacodinámica pueden incluir, pero sin limitarse a, dirigirse a células tumorales específicas o bloquear mecanismos de señalización, medir la reducción de las células que expresan el antígeno objetivo o las señales, etc. Las variantes de Fc de la presente aplicación pueden dirigirse a poblaciones de células efectoras particulares y así dirigir los polipéptidos Fc a reclutar determinadas actividades para mejorar la potencia o aumentar la penetración en un compartimento fisiológico particularmente favorable. Por ejemplo, la actividad y localización de neutrófilos pueden ser el objetivo de una variante de Fc que se dirige preferentemente a FcγRIIIb. Tales efectos farmacodinámicos se pueden demostrar en modelos animales o en humanos.

Uso terapéutico de las variantes de Fc

15 Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden usarse para varios propósitos terapéuticos. Como se apreciará por aquellos en la técnica, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden usarse para cualquier propósito terapéutico para los que se pueden usar anticuerpos, fusiones de Fc, y similares. En una modalidad preferida, las variantes de Fc se administran a un paciente para tratar trastornos que incluyen pero sin limitarse a enfermedades autoinmunes e inflamatorias, enfermedades infecciosas, y cáncer.

20 Un "paciente" para los propósitos de la presente invención incluye tanto humanos como otros animales, preferentemente mamíferos y con la máxima preferencia humanos. Así las variantes de Fc de la presente solicitud tienen aplicaciones tanto en la terapia humana como en la veterinaria. El término "tratamiento" en la presente invención se entiende que incluye tratamiento terapéutico, así como profiláctico, o medidas supresoras para una enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, la administración exitosa de una variante de Fc antes del inicio de una enfermedad resulta en el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración exitosa de una variante de Fc optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. "Tratamiento" además abarca la administración de una variante de Fc optimizada después de la aparición de la enfermedad con el fin de erradicar la enfermedad. La administración exitosa de un agente después del inicio y después de que se desarrollaron los síntomas clínicos, con una posible reducción de los síntomas clínicos y quizás una mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "en necesidad de tratamiento" incluyen mamíferos, que ya tienen la enfermedad o trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o trastorno, que incluye aquellos en los que la enfermedad o trastorno debe prevenirse -.

35 En una modalidad, una variante de Fc de la presente solicitud se administra a un paciente que tiene una enfermedad que implica la expresión inadecuada de una proteína u otra molécula. Dentro del alcance de la presente invención se entiende que incluye enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes, debidas por ejemplo a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, localización de la proteína, modificaciones postraduccionales, estado conformacional, la presencia de una proteína mutante o patogénica, etc. Igualmente, la enfermedad o trastorno se puede caracterizar por moléculas alteradas que incluyen pero sin limitarse a polisacáridos y gangliósidos. Una sobreabundancia puede deberse a cualquier causa, que incluye pero sin limitarse la sobreexpresión a nivel molecular, la aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción, o una actividad aumentada de una proteína con relación a lo normal. En esta definición se incluyen las enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción de una proteína. Esta reducción puede deberse a cualquier causa, que incluye sin limitarse a, la expresión reducida a nivel molecular, la aparición acortada o reducida en el sitio de acción, las formas mutantes de la proteína, o la actividad disminuida de la proteína en relación a lo normal. Tal sobreabundancia o reducción de una proteína puede medirse en relación a la expresión normal, aparición, o actividad de una proteína, y dicha medición puede jugar un papel importante en el desarrollo y/o prueba clínica de las variantes de Fc de la presente solicitud.

50 "Cáncer" y "canceroso" en la presente descripción se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero sin limitarse a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (que incluyen liposarcoma), tumores neuroendocrinos mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o tumores malignos linfoides.

55 Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen malignidades hematológicas, tales como linfoma de Hodgkin; linfoma no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño / leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células peludas y leucemia linfoplasmacítica), tumores de las células precursoras de linfocitos, que incluyen leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células B, y leucemia/linfoma linfoblástico agudo de células T, timoma, tumores de las células T y NK maduras, que incluyen leucemias de células T periféricas, leucemia de células T/linfoma de células T adultas y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides tales como leucemias, que incluyen AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos, y trastornos mieloproliferativos crónicos, que incluyen leucemia mielode crónica; tumores del sistema nervioso central tal como

glioma, glioblastoma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma, y retinoblastoma; tumores sólidos de la cabeza y el cuello (por ejemplo, cáncer nasofaríngeo, carcinoma de glándulas salivares, y cáncer esofágico), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón), cáncer del sistema digestivo (por ejemplo, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer del conducto biliar o del tracto biliar, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, y carcinoma anal), del sistema reproductivo (por ejemplo, cáncer testicular, de pene, o próstata, cáncer uterino, vaginal, vulval, cervical, de ovario, y endometrial), piel (por ejemplo melanoma, carcinoma de células basales, cáncer de células escamosas, keratosis actínica), hígado (por ejemplo, cáncer de hígado, carcinoma hepático, cáncer hepatocelular, y hepatoma), hueso (por ejemplo osteoclastoma, y cánceres de hueso osteolíticos), tejidos y órganos adicionales (por ejemplo, cáncer pancreático, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o cáncer renal, cáncer de tiroides, cáncer de mamas, cáncer del peritoneo, y sarcoma de Kaposi), y tumores del sistema vascular (por ejemplo angiosarcoma y hemangiopericitoma).

"Las enfermedades autoinmunes" en la presente descripción incluyen rechazo del injerto alógeno de islotes, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmune de Addison, autoanticuerpos citoplasmáticos de antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunes de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmune, hepatitis autoinmune, miocarditis autoinmune, neutropenia autoinmune, ooforitis y orquitis autoinmune, trombocitopenia autoinmune, urticaria autoinmune, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmune de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad por aglutininas frías, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, la deficiencia de factor VIII, la fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), tiroiditis de Hashimoto, hemofilia A, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura idiopática trombocitopénica (ITP), neuropatía IgA, polineuropatías IgM, trombocitopenia mediada inmune, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, rechazo al trasplante de órgano sólido, síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, arteritis de Takayasu, arteritis temporal / arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombótica, colitis ulcerativa, uveitis, vasculitis, tal como la vasculitis herpetiforme, dermatitis, vitiligo, y granulomatosis de Wegener.

Los "trastornos inflamatorios" en la presente descripción incluyen síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), artritis séptica aguda, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, alergia, asma, aterosclerosis, inflamación crónica debida a infecciones bacterianas o virales crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de la arteria coronaria, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, osteolisis inflamatoria, inflamación asociada con reacciones de hipersensibilidad aguda y retrasada, inflamación asociada con tumores, lesión del nervio periférico o enfermedades desmielinizantes, inflamación asociada con trauma del tejido tales como quemaduras e isquemia, inflamación debida a meningitis, síndrome de lesión de múltiples órganos, fibrosis pulmonar, sepsis y choque séptico, síndrome de Stevens-Johnson, artropía indiferenciada, y la espondiloartropatía indiferenciada.

Las "enfermedades infecciosas" en la presente descripción incluyen enfermedades causadas por patógenos tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas por virus que incluyen adenovirus, citomegalovirus, dengue, Epstein-Barr, hanta, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, herpes simplex tipo I, herpes simplex tipo II, virus de la inmunodeficiencia humana, (HIV), virus del papiloma humano (HPV), influenza, sarampión, las paperas, virus papova, polio, virus sincitial respiratorio, peste bovina, rinovirus, rotavirus, rubéola, virus del SARS, viruela, meningitis viral, y similares. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas además por bacterias que incluyen Bacillus anthracis, Borrelia burgdorferi, Campylobacter jejuni, Chlamydia trachomatis, Clostridium botulinum, Clostridium tetani, Diphtheria, E. coli, Legionella, Helicobacter pylori, Mycobacterium rickettsia, Mycoplasma nesissaria, Pertussis, Pseudomonas aeruginosa, S. pneumonia, Streptococcus, Staphylococcus, Vibria cholerae, Yersinia pestis, y similares. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas además por hongos tales como Aspergillus fumigatus, Blastomyces dermatitidis, Candida albicans, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans, Histoplasma capsulatum, Penicillium marneffeii, y similares. Las enfermedades infecciosas pueden ser causadas además por protozoos y parásitos tales como clamidia, kokzidioa, leishmania, la malaria, rickettsia, tripanosoma, y similares.

Además, las variantes de Fc de la presente solicitud puede usarse para prevenir o tratar afecciones adicionales que incluyen pero sin limitarse a afecciones del corazón, como insuficiencia cardíaca congestiva(CHF), miocarditis y otras afecciones del miocardio; afecciones de la piel tales como rosácea, acné, y eczema; afecciones óseas y de los dientes tales como pérdida ósea, osteoporosis, enfermedad de Paget, histiocitosis de las células de Langerhans, enfermedad periodontal, osteopenia difusa, osteomalacia, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa poliostótica, metástasis ósea, la gestión de dolor de huesos, hipercalcemia maligna humoral, reconstrucción periodontal, lesión de la médula

espinal, y fracturas óseas; afecciones metabólicas tales como la enfermedad de Gaucher; afecciones endocrinas como el síndrome de Cushing; y afecciones neurológicas.

Formulación, administración, y dosificación

5 Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde una variante de Fc de la presente solicitud y uno o más agentes terapéuticamente activos se formulan. Las formulaciones de las variantes de Fc de la presente solicitud se preparan para almacenamiento mediante la mezcla de dicha variante de Fc que tiene el grado de pureza deseado con portadores excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen amortiguadores tales como fosfato, citrato, acetato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencil cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; alquil parabenos tales como metilo o propilparabén; catacol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 residuos) ; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; endulzantes y otros agentes saborizantes; rellenos tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes de unión; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos de metal (por ejemplo, los complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tal como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una modalidad preferida, la composición farmacéutica que comprende la variante de Fc de la presente solicitud puede estar en una forma soluble en agua, tal como estar presente como sales farmacéuticamente aceptables, lo que pretende incluir sales de adición tanto ácidas como básicas. "Sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente o de ninguna otra forma indeseables, formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido salicílico y similares.. "Sales de adición básica farmacéuticamente aceptables" incluyen aquellas derivadas a partir de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso aluminio y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, potasio, sodio, calcio, y magnesio. Las sales derivadas a partir de bases farmacéuticamente aceptables orgánicas no tóxicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias, y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, y etanolamina. Las formulaciones para usar en la administración *in vivo* son de preferencia estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

40 Las variantes de Fc descritas en la presente se pueden formular además como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula muy pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que es útil para suministrar un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la variante de Fc se preparan por métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y otros, 1985, Proc Natl Acad Sci USA, 82:3688; Hwang y otros, 1980, Proc Natl Acad Sci USA, 77:4030; US 4,485,045; US 4,544,545; y PCT WO 97/38731. Los liposomas con un tiempo de circulación mejorado se describen en US 5,013,556. Los componentes del liposoma comúnmente se ordenan en una formación en bicapa, similar al arreglo lipídico de las membranas biológicas. Particularmente, los liposomas útiles se pueden generar por el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidil etanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas son extrudidos a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo opcionalmente está contenido dentro del liposoma (Gabizon y otros, 1989, J National Cancer Inst 81:1484).

55 La variante de Fc y otros agentes terapéuticamente activos pueden atraparse en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen pero sin limitarse a técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo mediante el uso de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina, o microcápsulas de poli-(metilmetacilato)), sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina , microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), y macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ta edición, Osol, A. Ed., 1980. Las preparaciones de liberación sostenida pueden prepararse. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólido, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), poliláctidos (US 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, copolímeros de acetato de etileno- vinilo no degradable, ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT® (que son

microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico, y ProLease® (disponible comercialmente de Alkermes), que es un sistema de liberación basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólido (PLG).

5 La administración de una composición farmacéutica que comprende una variante de Fc de la presente solicitud, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse en una variedad de formas, que incluyen pero sin limitarse a la vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraótica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, parenteral, rectal o intraocular
10 En algunos casos, por ejemplo para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la variante de Fc puede aplicarse directamente como una solución o un aerosol. Como se conoce en la técnica, la composición farmacéutica se puede formular en consecuencia en dependencia de la manera de introducción.

15 La administración subcutánea puede ser preferible en algunas circunstancias debido a que el paciente puede auto administrarse la composición farmacéutica. Muchas proteínas terapéuticas no son suficientemente potentes para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente efectiva en el máximo volumen aceptable para la administración subcutánea. Este problema se puede abordar en parte por el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato (ver WO 04091658). Los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden ser más susceptibles para la administración subcutánea debido, por ejemplo, al aumento de la potencia, vida media en suero
20 mejorada, o solubilidad mejorada.

Como se conoce en la técnica, las proteínas terapéuticas se suministran frecuentemente por infusión IV o bolo. Las variantes de Fc de la presente solicitud también se pueden administrar mediante el uso de tales métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con 0.9% cloruro de sodio como vehículo de infusión.

25 El suministro pulmonar puede lograrse mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de aerosolización. Por ejemplo, se pueden usar la tecnología inhalable AERx® comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de suministro pulmonar Inhance™ comercialmente disponible de Nektar terapéuticos. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ser más susceptibles para el suministro intrapulmonar. FcRn está presente en el pulmón, y puede promover el transporte desde el pulmón hasta el flujo sanguíneo (por ejemplo Syntonix WO 04004798, Bitonti y otros (2004) Proc. Nat. Acad. Sci. 101:9763-8). En consecuencia, los anticuerpos que unen FcRn más efectivamente en el pulmón o que se liberan más eficazmente en el flujo sanguíneo pueden tener una biodisponibilidad mejorada después de la administración intrapulmonar. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden además ser más susceptibles para la administración intrapulmonar debido a, por ejemplo, la solubilidad
30 mejorada o el punto isoeléctrico alterado.

Además, los polipéptidos Fc de la presente solicitud pueden ser más susceptibles para el suministro oral debido a, por ejemplo, una estabilidad mejorada a pH gástrico y una mayor resistencia a la proteólisis. Además, el FcRn parece expresarse en el epitelio intestinal en adultos (Dickinson y otros, 1999, J Clin Invest 104:903-11), por lo tanto los polipéptidos Fc de la presente invención, por ejemplo anticuerpos o fusiones de Fc, con perfiles de interacción con FcRn mejorados pueden mostrar viabilidad mejorada después de la administración oral. El transporte de las variantes de Fc mediado por FcRn puede además ocurrir en las otras membranas mucosas tales como aquellas en los tractos gastrointestinal, respiratorio, y genital (Yoshida y otros, 2004, Immunity 20:769-83).

45 Adicionalmente, en la técnica se conoce cualquier número de sistemas de suministro y se pueden usar para administrar las variantes de Fc de la presente solicitud. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microesferas (por ejemplo microesferas de PLA/PGA, y similares. Alternativamente, se puede usar un implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o matriz tal como poliésteres, hidrogeles, poli(vinilalcohol), polilactidas, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilvinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT®, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Es además posible administrar un ácido nucleico que codifica una variante de Fc de la presente solicitud, por ejemplo, por infección retroviral, inyección directa, o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular, u otros agentes de transfección. En todos los casos, los sistemas de liberación controlada se pueden usar para liberar la variante de Fc en o cerca del lugar de acción deseado.
50

Las cantidades de dosificación y frecuencia de administración, en una modalidad preferida, se seleccionan para ser terapéuticamente o profilácticamente efectivas. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para la degradación de la proteína, suministro sistémico contra localizado, y velocidad de síntesis de nuevas proteasas, así como también la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, interacciones del fármaco y la severidad de la afección, y serán comprobables con experimentación de rutina por aquellos con experiencia en la técnica.
60

5 La concentración de la variante de Fc terapéuticamente activa en la formulación puede variar de aproximadamente 0.1 a 100 % de peso. En una modalidad preferida, la concentración de la variante de Fc está en el intervalo de 0.003 a 1.0 molar. Con el fin de tratar un paciente se puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva de la variante de Fc de la presente solicitud. Por "dosis terapéuticamente efectiva" en la presente se entiende una dosis que produce el efecto para el cual se administró. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y se determinará por una persona con experiencia en la técnica mediante el uso de técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden estar en el intervalo de 0.0001 a 100 mg/kg de peso corporal o mayor, por ejemplo 0.1, 1, 10, o 50 mg/kg de peso corporal, y se prefiere 1 a 10mg/kg.

10 En algunas modalidades, se usa solamente una dosis única de la variante de Fc. En otras modalidades, se administran múltiples dosis de la variante de Fc. El tiempo transcurrido entre administraciones puede ser menor que 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, o más de 2 semanas.

20 En otras modalidades las variantes de Fc de la presente solicitud se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea por infusión continua o administración frecuente sin extensos períodos de descanso. Tal administración metronómica puede involucrar dosificación a intervalos constantes sin períodos de descanso. Típicamente tales regímenes abarcan bajas dosis crónicas o infusión continua por un período de tiempo extendido, por ejemplo 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses, o hasta 6 meses o más. El uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de descanso.

25 En ciertas modalidades la variante de Fc de la presente solicitud y uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. Las terapias cíclicas involucran la administración de un primer agente en un momento, un segundo agente en un segundo momento, opcionalmente agentes adicionales en momentos adicionales, opcionalmente un período de descanso, y después la repetición de esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos es típicamente de 2 - 10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios, o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

Terapias de Combinación y Co- terapias

35 Las variantes de Fc de la presente aplicación pueden administrarse concomitantemente con uno más de otros regímenes o agentes terapéuticos. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden usarse para mejorar la eficacia o seguridad de la variante de Fc. Además, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales se pueden usar para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción de la variante de Fc. Por ejemplo, una variante de Fc de la presente solicitud puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o ambas quimioterapia y terapia de radiación. La variante de Fc de la presente solicitud puede administrarse en combinación con uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos, que incluyen pero sin limitarse a agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteína tirosina quinasa (PTK), variantes de Fc adicionales, FcγRIIIb u otros inhibidores del receptor Fc, u otros agentes terapéuticos.

45 Los términos "en combinación con" y "coadministración" no se limitan a la administración de dichos agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En cambio, se entiende que la variante de Fc de la presente invención y el otro agente o agentes se administran en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de forma tal que ellos pueden actuar juntos para proporcionar un beneficio que aumenta contra el tratamiento con solamente ya sea la variante de Fc de la presente solicitud o el otro agente o agentes. Se prefiere que la variante de Fc y el otro agente o agentes actúen de forma aditiva, y especialmente se prefiere que actúen sinérgicamente. Tales moléculas se presentan adecuadamente en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito que se pretende. El médico experto puede determinar empíricamente, o considerando las farmacocinéticas y modos de acción de los agentes, la dosis o las dosis adecuadas de cada agente terapéutico, así como los momentos y métodos apropiados de administración.

55 En una modalidad, las variantes de Fc de la presente solicitud se administran con una o más moléculas adicionales que comprenden anticuerpos o Fc. Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden coadministrarse con uno o más de otros anticuerpos que tienen eficacia en el tratamiento de la misma enfermedad o una comorbilidad adicional; por ejemplo pueden administrarse dos anticuerpos que reconocen dos antígenos que se sobre expresan en un tipo de cáncer dado, o dos antígenos que median la patogénesis de una enfermedad autoinmune o infecciosa.

60 Los ejemplos de anticuerpos anticancerosos que pueden coadministrarse incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos de antígenos de la superficie celular anti 17-1A tales como Panorex™ (edrecolomab); anticuerpos anti-4-1BB; anticuerpos

anti-4Dc; anticuerpos anti-A33 tales como A33 y CDP-833; anticuerpos integrina anti- α 4 β 1 tales como natalizumab; anticuerpos integrina anti- α 4 β 7 tales como LDP-02; anticuerpos integrina anti- α V β 1 tales como F-200, M-200, y SJ-749; anticuerpos integrina anti- α V β 3 tales como abciximab, CNTO-95, Mab-17E6, y Vitaxin™; anticuerpos del factor 5 (C5) anti-complemento tal como 5G1.1; anticuerpos anti-CA125 tales como OvaRex® (oregovomab); anticuerpos anti-CD3 tales como Nuvion® (visilizumab) y Rexomab; anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A; anticuerpos anti-CD6 tales como Oncolysin B y Oncolysin CD6; anticuerpos anti-CD7 tales como HB2; anticuerpos anti-CD19 tales como B43, MT-103, y Oncolysin B; anticuerpos anti-CD20 tales como 2H7, 2H7.v16, 2H7.v114, 2H7.v115, Bexxar® (tositumomab), Rituxan® (rituximab), Zevalin® (Ibritumomab tiuxetan), y PRO70769; anticuerpos anti-CD22 tales como Lymphocide™ (epratuzumab); anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC-152; anti-CD25 anticuerpos tales como basiliximab y Zenapax® (daclizumab); anticuerpos anti-CD30 tales como AC10, MDX-060, y SGN-30; anticuerpos anti-CD33 tales como Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin), Oncolysin M, y Smart M195; anticuerpos anti-CD38; anticuerpos anti-CD40 tales como SGN-40 y toralizumab; anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova™, y IDEC-131; anticuerpos anti-CD44 tales como bivatumzumab; anticuerpos anti-CD46; anticuerpos anti-CD52 tales como Campath® (alemtuzumab); anticuerpos anti-CD55 tales como SC-1; anticuerpos anti-CD56 tales como huN901-DM1; anti-CD64 anticuerpos tales como MDX-33; anti-CD66e anticuerpos tales como XR-303; anticuerpos anti-CD74 tales como IMMU-110; anticuerpos anti-CD80 tales como galiximab y IDEC-114; anticuerpos anti-CD89 tales como MDX-214; anticuerpos anti-CD123; anticuerpos anti-CD138 tales como B-B4-DM1; anticuerpos anti-CD146 tales como AA-98; anticuerpos anti-CD148; anticuerpos anti-CEA tales como cT84.66, labetuzumab, y Pentacea™; anticuerpos anti-CTLA-4 tales como MDX-101; anticuerpos anti-CXCR4; anticuerpos tales como ABX-EGF, Erbitux® (cetuximab), IMC-C225, y Merck Mab 425; anticuerpos anti-EpCAM tales como Crucell's anti-EpCAM, ING-1, y IS-IL-2; anticuerpos anti-ephrin B2/EphB4; anticuerpos anti-Her2 tales como Herceptin®, MDX-210; anticuerpos anti-FAP (proteína de activación de fibroblastos) tales como sibrotuzumab; anticuerpos anti-ferritina tales como NXT-211; anticuerpos anti-FGF-1; anticuerpos anti-FGF-3; anticuerpos anti-FGF-8; anticuerpos anti-FGFR, anticuerpos anti-fibrina; anticuerpos anti-G250 tales como WX-G250 y Rencarex®; anticuerpos gangliosidos anti-GD2 tales como EMD-273063 y TriGem; anticuerpos gangliosidos anti-GD3 tales como BEC2, KW-2871, y mitumomab; anticuerpos anti-gpIIb/IIIa tales como ReoPro; anticuerpos anti-heparinasa; anticuerpos anti-Her2/ErbB2 tales como Herceptin® (trastuzumab), MDX-210, y pertuzumab; anticuerpos anti-HLA tales como Oncolym®, Smart 1D10; anticuerpos anti-HM1.24; anticuerpos anti-ICAM tales como ICM3; anticuerpos del receptor anti-IgA; anticuerpos anti-IGF-1 tales como CP-751871 y EM-164; anticuerpos anti-IGF-1 R tales como IMC-A12; anticuerpos anti-IL-6 tales como CNTO-328 y elsilimomab; anticuerpos anti-IL-15 tales como HuMax™-IL15; anticuerpos anti-KDR; anticuerpos anti-laminina 5; anticuerpos del antígeno anti-Lewis Y tales como Hu3S193 y IGN-311; anticuerpos anti-MCAM; anticuerpos anti-Muc1 tales como BravaRex y TriAb; anticuerpos anti-NCAM tales como ERIC-1 e ICRT; anticuerpos del antígeno anti-PEM tales como Theragyn y Therex; anticuerpos anti-PSA; anticuerpos anti-PSCA tales como IG8; anticuerpos anti-Ptk ; anticuerpos anti-PTN; anticuerpos anti-RANKL tales como AMG-162; anticuerpos anti-RLIP76; anticuerpos del antígeno anti-SK-1 tales como Monopharm C; anticuerpos anti-STEAP; anticuerpos anti-TAG72 tales como CC49-SCA y MDX-220; anticuerpos anti-TGF- β tales como CAT-152; anticuerpos anti-TNF- α tales como CDP571, CDP870, D2E7, Humira® (adalimumab), y Remicade® (infliximab); anticuerpos anti-TRAIL-R1 y TRAIL-R2; anticuerpos anti-VE-cadherina-2; y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren™. Además, pueden usarse los anticuerpos anti-idiotipo que incluyen pero sin limitarse al anticuerpo del epítipo GD3 BEC2 y el anticuerpo del epítipo gp72 105AD. Adicionalmente, pueden usarse anticuerpos biespecíficos que incluyen pero sin limitarse al anticuerpo Bi20 anti-CD3/CD20.

Los ejemplos de anticuerpo que pueden coadministrarse para tratar una enfermedad autoinmune o inflamatoria, rechazo al trasplante, GVHD, y similares incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos anti-integrina α 4 β 7 tales como LDP-02, anticuerpos anti-integrina anti-beta2 tales como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) tales como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 tales como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3, SMART anti-CD3, anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD14 tales como IC14, anticuerpos anti-CD18, anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 tales como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 tales como IDEC-114, anticuerpos anti-CD147 tales como ABX-CBL, anticuerpos anti-E-selectina tales como CDP850, anticuerpos anti-gpIIb/IIIa tales como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 tales como ICM3, anticuerpos anti-ICE tales como VX-740, anticuerpos anti-FcR1 tales como MDX-33, anticuerpos anti-IgE tales como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 tales como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 tales como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 tales como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma, y anticuerpos anti-TNF α tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren. Los ejemplos de otras moléculas que contienen Fc que se pueden coadministrar para tratar enfermedades autoinmunes o inflamatorias, rechazo de trasplante, GVHD, y similares incluyen, pero sin limitarse a, receptor de TNF p75/ fusión de Fc Enbrel® (etanercept) y la trampa de IL1 de Regeneron.

Los ejemplos de anticuerpos que se pueden coadministrar para tratar enfermedades infecciosas incluyen, pero sin limitarse a, anticuerpos anti-antrax tales como ABthrax, anticuerpos anti-CMV tales como CytoGam y sevirumab, anticuerpos anti-criptosporidio tales como CryptoGAM, Sporidin-G, anticuerpos anti-helicobacter tales como Pyloran, anticuerpos anti-hepatitis B tales como HepeX-B, Nabi-HB, anticuerpos anti-HIV tales como HRG-214, anticuerpos anti-

RSV tales como felvizumab, HNK-20, palivizumab, RespiGam, y anticuerpos anti-estafilococos tales como Aurexis, Aurograb, BSYX-A110, y SE-Mab.

5 Alternativamente, las variantes de Fc de la presente solicitud se pueden coadministrar con una o más de otras moléculas que compiten por la unión a uno o más receptores Fc. Por ejemplo, coadministrar inhibidores del receptor inhibitorio FcγRIIb puede resultar en una función efectora aumentada. Similarmente, coadministrar inhibidores de receptores activadores, por ejemplo FcγRIIIa, puede minimizar la función efectora no deseada. Los inhibidores del receptor Fc incluyen pero sin limitarse a las variantes de Fc que se modifican para actuar como inhibidores competitivos de FcγR, como también inmunoglobulinas y específicamente inmunoglobulinas intravenosas (IVIg). En una modalidad, se administra el inhibidor y se le permite actuar antes de que se administre la variante de Fc. Una manera alternativa de lograr el efecto de dosificación secuencial sería proporcionar una forma de dosificación de liberación inmediata del inhibidor del receptor Fc y después una formulación de liberación sostenida de la variante de Fc de la aplicación. Las formulaciones de liberación inmediata y liberación controlada pueden administrarse separadamente o combinarse en una forma de dosificación de una unidad. La administración de un inhibidor de FcγRIIb puede además usarse para limitar respuestas inmunes no deseadas, por ejemplo la respuesta de anticuerpos anti-Factor VIII después de la administración del Factor VIII a hemofílicos.

En una modalidad, las variantes de Fc de la presente solicitud se administran con un agente quimioterapéutico. Por "agente quimioterapéutico" como se usa en la presente se entiende un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen pero sin limitarse a agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquil sulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; andrógenos tales como calusterona, dromostanolona propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; antiandrogenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelin; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicheamicina, carabycin, caminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antiestrógenos que incluyen por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, aromatasas inhibidor 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifena (Fareston); anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterin, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; aziridinas tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen alretamina, trietilenemelamina, trietilenofosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; reabastecedores de ácido fólico tales como ácido frolinico; mostazas de nitrógeno tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamina óxido hidrócloro, melfalano, novembicina, fenesterine, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocin, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; proteínas tales como arginina deiminasa y asparaginasa; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; inhibidor de la timidilato sintasa (tales como Tomudex); quimioterapéuticos adicionales incluidos aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziouona; difluorometilornitina (DMFO); elformitina; eliptinio acetato; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PK®; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2, 2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitosina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; clorambucil; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina. Además se pueden usar sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un quimioterapéutico u otro agente citotóxico puede administrarse como un profármaco. Por "profármaco" como se usa en la presente se entiende una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica a células tumorales en comparación a el fármaco parental y es capaz de activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Ver, por ejemplo Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14:375-382; y Stella y otros, "Profármacos: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt y otros, (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Los profármacos que pueden encontrar uso con la presente invención incluyen pero sin limitarse a profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosulfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados de aminoácido D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen betalactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir en el fármaco libre citotóxico más activo. Los

ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profármaco para usar con las variantes de Fc de la presente solicitud incluyen pero sin limitarse a cualquiera de los agentes quimioterapéutico anteriormente mencionados.

5 Una variedad de otros agentes terapéuticos pueden encontrar uso para la administración con las variantes de Fc de la presente solicitud. En una modalidad, la variante de Fc se administra con un agente antiangiogénico. Por "agente antiangiogénico" como se usa en la presente se entiende un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede, por ejemplo, ser una pequeña molécula o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión de Fc, o citocina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento involucrado en promover la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido en la presente es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF). Otros agentes que inhiben la señalización a través del VEGF pueden además usarse, por ejemplo, terapéuticos basados en ARN que reducen los niveles de VEGF o la expresión del VEGF-R, fusiones VEGF-toxina, trampa de VEGF de Regeneron, y anticuerpos que se unen al VEGF-R. En una modalidad alterna, la variante de Fc se administra con un agente terapéutico que induce o mejora la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo un anticuerpo dirigido a CTLA-4. Los agentes antiangiogénesis adicionales incluyen, pero sin limitarse a, angiostatina (fragmento de plasminógeno), antitrombina III, angiozima, ABT-627, Bay 12-9566, benefina, bevacizumab, bisfosfonatos, BMS-275291, inhibidor derivado de cartílago(CDI), CAI, fragmento de complemento CD59, CEP-7055, Col 3, combretastatina A-4, endostatina (fragmento de colágeno XVIII), inhibidores de la farnesil transferasa, fragmento de fibronectina, gro-beta, halofuginona, heparinasas, fragmento de heparina hexasacárido, HMV833, gonadotropina coriónica humana (hCG), IM-862, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, proteína inducible por interferón 10 (IP-10), interleucina-12, kringle 5 (fragmento de plasminógeno), marimastat, inhibidores de metaloproteínasa (por ejemplo, TIMPs), 2-metodiestradiol, MMI 270 (CGS 27023A), inhibidor de la actividad del plasminógeno (PAI), factor-4 de plaquetas (PF4), prinomastat, fragmento de prolactina de 16kDa, proteína relacionada con la proliferina (PRP), PTK 787/ZK 222594, retinoides, solimastat, escualamina, SS3304, SU5416, SU6668, SU11248, tetrahydrocortisol-S, tetratiomolibdato, talidomida, trombospondina-1 (TSP-1), TNP-470, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), vasculostatina, vasostatina (fragmento de calreticulina), ZS6126, y ZD6474.

30 En una modalidad preferida, la variante de Fc se administra con un inhibidor de tirosina quinasa. Por "inhibidor de tirosina quinasa" como se usa en la presente se entiende una molécula que inhibe en alguna medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. Los ejemplos de tales inhibidores incluyen pero sin limitarse a quinazolinas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrololo(2,3-d) pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)- ftalimida); tirfostinas que contienen porciones nitrotiofeno; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo las que se unen al ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (US 5,804,396); trifostinas (US 5,804,396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); inhibidores pan-ErbB tales como C1-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de Imatinib (STI571, Gleevec®; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); C1-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: US 5,804,396; PCT WO 99/09016 (American Cyanimid); PCT WO 98/43960(American Cyanamid); PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT WO96/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA™, ZD1839, AstraZeneca), y OSI-774 (Tarceva™, OSI Pharmaceuticals/Genentech).

45 En otra modalidad, la variante de Fc se administra con uno o más agentes inmunomoduladores. Tales agentes pueden aumentar o disminuir la producción de una o más citocinas, regular ascendente o descendentemente la presentación de autoantígeno, enmascarar los antígenos MHC, o promover la proliferación, la diferenciación, la migración, o estado de activación de uno o más tipos de células inmunes. Los agentes inmunomoduladores incluyen pero sin limitarse a: fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs) tales como aspirina, ibuprofeno, celecoxib, diclofenaco, etodolac, fenoprofeno, indometacina, ketoralaco, oxaprozina, nabumentona, sulindaco, tolmentina, rofecoxib, naproxeno, cetoprofeno, y nabumetone; esteroides (por ejemplo glucocorticoides, dexametasona, cortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisona, prednisolona, triamcinolona, azulfidinaicosanoides tales como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos; así como también esteroides tópicos tales como antralina, calcipotriena, clobetasol, y tazaroteno); citocinas tales como TGF β , IFN α , IFN β , IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10; citocina, quimocina, o antagonistas receptores que incluyen anticuerpos, receptores solubles, y fusiones receptor-Fc contra BAFF, B7, CCR2, CCR5, CD2, CD3, CD4, CD6, CD7, CD8, CD11, CD14, CD15, CD17, CD18, CD20, CD23, CD28, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD52, CD64, CD80, CD86, CD147, CD152, factores del complemento (C5, D) CTLA4, eotaxina, Fas, ICAM, ICOS, IFN α , IFN β , IFN γ , IFNAR, IgE, IL-1, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5R, IL-6, IL-8, IL-9, IL-12, IL-1.3, IL-13R1, IL-15, IL-18R, IL-23, integrinas, LFA-1, LFA-3, MHC, selectinas, TGF β , TNF α , TNF β , TNF-R1, receptor de células T, que incluyen Enbrel® (etanercept), Humira® (adalimumab), y Remicade® (infliximab); globulina anti-linfocitos heteróloga; otras molécula inmunomoduladoras tales como 2-amino-6-arilo-5 pirimidinas sustituidas, anticuerpos anti-idiotípicos para los péptidos de unión al MHC y fragmentos de MHC, azatioprina, brequinar, bromocriptina, ciclofosfamida, ciclosporina A, D-

penicilamina, deoxispergualina, FK506, glutaraldehído, oro, hidroxicloquina, leflunomida, malononitriloamidas (por ejemplo, leflunomida), metotrexato, minociclina, mizoribina, micofenolato mofetil, rapamicina, y sulfasasazina.

5 En una modalidad alterna, las variantes de Fc de la presente solicitud se administran con una citocina. Por "citocina"
 como se usa en la presente se entiende un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que
 actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas son linfoquinas, monoquinas,
 y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas incluidas están la hormona de crecimiento, tal como la
 hormona del crecimiento humano, hormona de crecimiento humano N-metionil, y hormona de crecimiento bovino
 hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como la
 hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); factor
 de crecimiento hepático, factor de crecimiento de fibroblasto; prolactina; lactógenogamma placentario; factor de necrosis
 tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor
 de crecimiento endotelial vascular; integrinas; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento del nervio tales como el
 NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF
 beta; factor de crecimiento I y II similar a la insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos, interferones tales
 como el interferón alfa, beta y gamma, factores estimulantes de colonias (CSF), tales como macrófagos-CSF (M-CSF);
 granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF) y granulocitos-CSF (G-CSF), interleucinas (IL), como la IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-
 3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, factor de necrosis tumoral como el TNF-alfa o TNF-beta; y
 otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se usa en la presente, el término citocina
 incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las
 citocinas de secuencia nativa.

25 En una modalidad preferida, las citocinas u otros agentes que estimulan las células del sistema inmune se
 coadministran con una variante de Fc de la presente solicitud. Tal modo de tratamiento puede mejorar la función
 efectora deseada. Por ejemplo, los agentes que estimulan las células NK, que incluyen pero sin limitarse a IL-2 pueden
 coadministrarse. En otra modalidad, los agentes que estimulan macrófagos, que incluyen pero sin limitarse a C5a,
 péptidos formilo tales como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (Beigier-Bompadre y otros (2003) Scand. J. Immunol. 57:
 221-8), pueden coadministrarse. Además, los agentes que estimulan neutrófilos, que incluyen pero sin limitarse a G-
 CSF, GM-CSF, y similares pueden administrarse. Además, los agentes que promueven la migración de tales citocinas
 inmunoestimuladoras se pueden usar. Otros agentes adicionales que incluyen pero sin limitarse a interferon gamma, IL-
 3 e IL-7 pueden promover una o más funciones efectoras. En una modalidad alterna, las citocinas u otros agentes que
 inhiben la función efectora celular se coadministran con una variante de Fc de la presente solicitud. Tal modo de
 tratamiento puede limitar la función efectora no deseada.

35 En una modalidad adicional, la variante de Fc se administra con uno o más antibióticos, que incluyen pero sin limitarse
 a: antibióticos aminoglicósidos (por ejemplo, apramicina, arbekacina, bambemicinas, butirosina, dibekacina,
 gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicinae, paromomicina, ribostamicina, sisomicina, spectrinomicina),
 aminociclitoles (por ejemplo, esprctinomicina), antibióticos de amfenicol (por ejemplo, azidamfenicol, cloramfenicol,
 florfrnicol, y thiamfenicol), antibióticos de ansamicina (por ejemplo, rifamida y rifampin), carbapenems (por ejemplo,
 imipenem, meropenem, panipenem); cefalosporinas (por ejemplo, cefaclor, cefadroxil, cefamandol, cefatrizina,
 cefazedona, cefozopran, cefpimizol, cefpiramida, cefpirome, cefprozil, cefuroxina, cefixima, cefalexina, cefradina),
 cefamicinas (cefbuperazona, cefoxitin, cefminox, cefmetazol, y cefotetan); lincosamidas (por ejemplo, clindamicina,
 lincomicina); macrólido (por ejemplo, azitromicina, bfredidin A, claritromicina, eritromicina, roxitromicina, tobramicina),
 monobactamas (por ejemplo, aztreonam, carumonam, y tigernonam); mupirocina; oxacefems (por ejemplo, flomoxef,
 latamoxef, y moxalactam); penicilinas (por ejemplo, amdinocilina, amdinocilina pivoxil, amoxicilina, bacampicilina, ácido
 bexzipenicilínico, bencilpenicilina sodio, epicilina, fenbenicilina, floxacilina, penamecilina, hidroyoduro de penetamato,
 penicilina o-benetamina, penicilina O, penicilina V, penicilina V benzoato, penicilina V hidrabamina, penimepiciclina, y
 fencihicilina potasio); polipeptidos (por ejemplo, bacitracina, colistina, polimixina B, teicoplanin, vancomicina); quinolonas
 (amifloxacin, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, enrofloxacin, feroxacin, flumequina, gatifloxacin, gemifloxacin,
 grepafloxacin, lomefloxacin, moxifloxacin, ácido nalidíxico, norfloxacin, ofloxacin, ácido oxolínico, pefloxacin,
 ácido pipemidico, rosoxacina, rufloxacin, sparfloxacin, temafoxacin, tosufloxacin, trovafoxacin); rifampina;
 streptogramins (por ejemplo, quinupristin, dalfopristin); sulfonamides (sulfanilamide, sulfametoxazol); tetraciclenos
 (clortetraciclina, demeclociclina hidrócluro, demetilclortetraciclina, doxiciclina, duramicina, minociclina, neomicina,
 oxitetraciclina, estreptomycin, tetraciclina, vancomicina).

55 Los agentes antifúngicos tales como anfotericina B, ciclopirox, clotrimazol, econazol, fluconazol, flucitosina, itraconazol,
 ketoconazol, niconazol, nistatina, terbinafina, teraconazol, y tioconazol pueden además usarse.

60 Los agentes antivirales que incluyen inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa, y otros, que incluyen
 interferones de tipo I, inhibidores de la fusión viral, e inhibidores de neuramidasa, pueden además usarse. Los ejemplos
 de los agentes antivirales que incluyen, pero sin limitarse a, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, clevadine,
 enfuvirtida, entecavir, foscarnet, gangciclovir, idoxuridina, indinavir, lopinavir, pleconaril, ribavirin, rimantadina, ritonavir,
 saquinavir, trifluridina, vidarabina, y zidovudina, pueden usarse.

Las variantes de Fc de la presente solicitud pueden combinarse con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, en una modalidad, el paciente que se va a tratar con un anticuerpo o fusión de Fc también puede recibir terapia de radiación. La terapia de radiación se puede administrar de acuerdo a protocolos comúnmente empleados en la técnica y conocidos para los expertos. Tal terapia incluye pero no se limita a radiaciones de cesio, iridio, yodo, o cobalto. La terapia de radiación puede ser irradiación del cuerpo completo, o puede dirigirse localmente a un sitio específico o tejido dentro o sobre el cuerpo, tales como el pulmón, la vejiga o la próstata. Típicamente, la terapia de radiación se administra en pulsos durante un período de tiempo por aproximadamente 1 a 2 semanas. La terapia de radiación puede, sin embargo, administrarse durante largos períodos de tiempo. Por ejemplo, la terapia de radiación puede administrarse a pacientes que tienen cáncer de cabeza y cuello por aproximadamente 6 a aproximadamente 7 semanas. Opcionalmente, la terapia de radiación puede administrarse como una única dosis o como dosis múltiples secuenciales. El médico experto puede determinar empíricamente la dosis o las dosis apropiadas de terapia de radiación útiles en la presente. De acuerdo con otra modalidad de la invención, la variante de Fc de la presente solicitud y una o más de otras terapias anticáncer se emplean para tratar células de cáncer *ex vivo*. Se contempla que tal tratamiento *ex vivo* puede ser útil en el trasplante de médula ósea y particularmente, trasplante de médula ósea autóloga. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejidos(s) que contienen células de cáncer con la variante de Fc y una o más de otras terapias anticáncer, tales como las descritas anteriormente, pueden emplearse para reducir o reducir sustancialmente las células de cáncer antes del trasplante en un paciente receptor.

La terapia de radiación puede además comprender el tratamiento con una molécula etiquetada isotópicamente, tal como un anticuerpo. Ejemplos de radioinmunoterapéuticos incluyen Zevalin™ (anti-CD20 etiquetado con Y-90, LymphoCide™ (anti-CD22 etiquetado con Y-90) y Bexxar™ (anti-CD20 etiquetado con I-131)

Por supuesto se contempla que las variantes de Fc de la aplicación se pueden emplear en combinación con aún otras técnicas terapéuticas tales como cirugía o fototerapia.

Diseño de ensayo clínico y estrategias de tratamiento post-aprobación.

Enfoques farmacogenómicos a los ensayos clínicos y la terapia son modalidades de la presente invención. Un número de los receptores que pueden interactuar con las variantes de Fc de la presente invención son polimórficos en la población humana. Para un paciente dado o población de pacientes, la eficacia de las variantes de Fc de la presente invención puede afectarse por la presencia o ausencia del polimorfismo específico en proteínas. Por ejemplo, el FcγRIIIa es polimórfico en la posición 158, que es comúnmente ya sea V (alta afinidad) o F (baja afinidad). Los pacientes con el genotipo V/V homocigótico se observa que tienen una mejor respuesta clínica al tratamiento con el anticuerpo anti-CD20 Rituxan® (rituximab) (Carton y otros, 2002, Blood 99:754-758; Weng y otros, 2003, J Clin Oncol 21:3940-3947; Dall'Ozzo y otros, 2004, Cancer Res 64:4664-9). Polimorfismos adicionales incluyen pero sin limitarse a FcγRIIIa R131 o H131, y tales polimorfismos se conoce que ya sea aumentan o disminuyen la unión al Fc y subsecuentemente la actividad biológica, en dependencia del polimorfismo. Las variantes de Fc de la presente solicitud se pueden unir preferentemente a una forma polimórfica particular de un receptor, por ejemplo FcγRIIIa F158, o unirse con equivalente afinidad a todos los polimorfismos en una posición particular en el receptor, por ejemplo ambos polimorfismos V158 y F158 de FcγRIIIa. En una modalidad preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud que proporcionan una unión equivalente a los polimorfismos pueden usarse en un anticuerpo para eliminar la eficacia diferencial vista en pacientes con diferentes polimorfismos. Tal propiedad puede dar una mayor consistencia en la respuesta terapéutica y reducir la población de pacientes que no responden. Tal variante de Fc con idéntica unión a los polimorfismos del receptor puede tener una actividad biológica, tal como ADCC, CDC o vida media en circulación aumentadas, o alternativamente disminución de la actividad, a través de la modulación de la unión a los receptores Fc relevantes. En una modalidad preferida, las variantes de Fc de la presente solicitud pueden unir con mayor o menor afinidad a uno de los polimorfismos de un receptor, ya sea acentuando la diferencia existente en la unión o revirtiendo la diferencia. Tal propiedad puede permitir la creación de terapéuticos particularmente adaptados para la eficacia con una población de pacientes que poseen tal polimorfismo. Por ejemplo, una población de pacientes que posee un polimorfismo en FcγRIIb que se une con mayor afinidad al Fc, puede recibir un fármaco que contiene una variante de Fc con unión reducida a tal forma polimórfica del receptor, lo que crea un fármaco más eficaz.

En una modalidad preferida, los pacientes se tamizan para uno o más polimorfismos con el fin de predecir la eficacia de las variantes de Fc de la presente invención. Esta información se puede usar, por ejemplo, para seleccionar pacientes para incluirlos o excluirlos de ensayos clínicos o, post-aprobación, para proporcionar orientación a los médicos y pacientes con respecto a las dosificaciones y opciones de tratamiento adecuadas. Por ejemplo, el anticuerpo rituximab anti-CD20 es mínimamente efectivo en pacientes que son homocigotos o heterocigotos para FcγRIIIa F158 (Carton y otros, 2002, Blood 99:754-758; Weng y otros, 2003, J Clin Oncol 21:3940-3947; Dall'Ozzo y otros, 2004, Cancer Res 64:4664-9). Tales pacientes pueden mostrar una respuesta clínica mejorada a anticuerpos que comprenden una variante de Fc de la presente solicitud. En una modalidad, los pacientes se seleccionan para la inclusión en ensayos clínicos si su genotipo indica que son propensos a responder significativamente mejor a un anticuerpo de la presente invención en comparación con uno o más anticuerpos terapéuticos usados actualmente. En otra modalidad, las

5 dosificaciones y regímenes de tratamiento adecuados se determinan mediante el uso de tal información del genotipo. En otra modalidad, los pacientes se seleccionan para la inclusión en un ensayo clínico o para recibir terapia post-aprobación basado en su polimorfismo de genotipo, donde tal terapia contiene una variante de Fc modificada para ser específicamente eficaz para tal población, o alternativamente donde tal terapia contiene una variante de Fc que no muestra actividad diferencial para las diferentes formas de polimorfismo.

10 Además se describen en la presente pruebas de diagnóstico para identificar pacientes que son propensos a mostrar una respuesta clínica favorable a una variante de Fc de la presente solicitud o que son propensos a exhibir una respuesta significativamente mejor cuando se tratan con una variante de Fc de la presente solicitud contra uno o más anticuerpos terapéuticos usados actualmente. Se puede usar cualquiera de un número de métodos conocidos en la técnica para determinar el poliformismo de FcγR en humanos.

15 En una modalidad preferida, los pacientes se tamizan para predecir la eficacia de los polipéptidos Fc de la presente solicitud. Esta información se puede usar, por ejemplo, para seleccionar pacientes para incluirlos o excluirlos de ensayos clínicos o, post-aprobación, para proporcionar orientación a los médicos y pacientes con respecto a las dosificaciones y opciones de tratamiento adecuadas. El tamizaje puede involucrar la determinación del nivel de expresión o la distribución del antígeno objetivo. Por ejemplo, el nivel de expresión de Her2/neu se usa actualmente para seleccionar qué pacientes responderán más favorablemente a la terapia con trastuzumab. El tamizaje puede además involucrar la determinación de los polimorfismos genéticos, por ejemplo los polimorfismos relacionados a FcγRs o FcαRs. Por ejemplo, los pacientes que son homocigotos o heterocigotos para la forma polimórfica F158 de FcγRIIIa pueden responder clínicamente más favorablemente al polipéptidos Fc de la presente solicitud. La información obtenida del tamizaje de pacientes se puede usar para seleccionar pacientes para la inclusión en ensayos clínicos, determinar la dosificación y regímenes de tratamiento adecuados, o para otras aplicaciones clínicas. Se describen en la presente pruebas de diagnóstico para identificar pacientes que son propensos a mostrar una respuesta clínica favorable a un polipéptido Fc de la presente solicitud, o que son propensos a exhibir una respuesta significativamente mejor cuando se tratan con un polipéptido Fc de la presente solicitud contra uno o más bioterapéuticos usados actualmente. Cualquiera de un número de métodos para determinar los niveles de expresión de antígeno, distribución de antígeno, y/o polimorfismos genéticos en humanos conocidos en la técnica se pueden usar.

20 Además, se describen pruebas de pronóstico que se realizan en muestras clínicas tales como sangre y muestras de tejidos. Tales pruebas pueden ensayar la actividad de la función efectora, que incluye pero sin limitarse a opsonización, ADCC, CDC, ADCP, o muerte, independientemente del mecanismo, de células cancerosas o de cualquier otra forma patogénicas. En una modalidad preferida, los ensayos de ADCC, tales como aquellos descritos en la presente, se usan para predecir, para un paciente específico, la eficacia de un polipéptido Fc dado de la presente solicitud. Tal información puede usarse para identificar a los pacientes para su inclusión o exclusión en los ensayos clínicos, o para informar las decisiones con respecto a las dosificaciones adecuadas y regímenes de tratamiento. Tal información puede usarse para seleccionar un fármaco que contiene una variante de Fc particular que muestra una actividad superior en tal ensayo.

40 EJEMPLOS

Se proporcionan ejemplos más abajo para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no se destinan a limitar la presente invención a cualquier aplicación o teoría de operación particular.

45 Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es acorde al índice EU o esquema de numeración EU (Kabat y otros, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5o. Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda), que se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman y otros, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85). Aquellos con experiencia en la técnica de anticuerpos apreciarán que estas convenciones consisten de una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, que permite una referencia normalizada a las posiciones conservadas en familias de inmunoglobulinas. En consecuencia, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada según se definen por el índice EU no corresponderán necesariamente con su secuencia secuencial. La Figura 3 muestra los esquemas de numeración secuencial y el índice EU para el anticuerpo alemtuzumab con el fin de ilustrar este principio más claramente. Debe notarse además que los polimorfismos se han observado en un número de posiciones del Fc, que incluyen pero sin limitarse a Kabat 270, 272, 312, 315, 356, y 358, y así pueden existir pequeñas diferencias entre las secuencias presentadas y las secuencias en la literatura científica.

55 Las variantes de Fc y bibliotecas de variante de Fc se diseñaron mediante el uso de métodos computacionales y basados en la secuencia como se describe en USSN 10/672,280 y USSN 10/822,231. Las bibliotecas experimentales se diseñaron en rondas sucesivas de tamizaje computacional y experimental. El diseño de bibliotecas de Fc subsecuentes se benefició de la retroalimentación de bibliotecas anteriores, y así típicamente comprendieron combinaciones de las variantes de Fc que mostraron propiedades favorables en los tamizajes previos. La Figura 4 muestra los residuos a los que se hicieron las modificaciones de aminoácidos en las variantes de Fc de la presente invención, localizados en la

estructura del Fc/Fc γ RIIIb humano. El conjunto completo de las variantes de Fc que se construyeron y probaron experimentalmente se muestran en la Figura 41.

Ejemplo 1: Biología molecular y expresión/ purificación de proteína

La mayoría de la experimentación sobre las variantes de Fc se llevó a cabo en el contexto del anticuerpo anticáncer alemtuzumab (Campath®, una marca registrada de Ilex Pharmaceuticals LP). Alemtuzumab une un epítipo lineal corto dentro de su antígeno objetivo CD52 (Hale y otros, 1990, Tissue Antigens 35:118-127; Hale, 1995, Immunotechnology 1:175-187). Alemtuzumab se seleccionó como plantilla modificada primaria debido a que su eficacia se debe en parte a su capacidad de reclutar células efectoras (Dyer y otros, 1989, Blood 73:1431-1439; Friend y otros, 1991, Transplant Proc 23:2253-2254; Hale y otros, 1998, Blood 92:4581-4590; Glennie y otros, 2000, Immunol Today 21:403-410), y porque la producción y el uso de su antígeno en ensayos de unión son relativamente sencillos. Con el fin de evaluar las variantes de Fc optimizadas de la presente invención en el contexto de otros anticuerpos, las variantes de Fc seleccionadas se evaluaron en el anticuerpo anti-Her2 trastuzumab (Herceptin®, una marca registrada de Genentech), el anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®, una marca registrada de IDEC Pharmaceuticals Corporation), el anticuerpo anti-EGFR cetuximab (Erbix®, una marca registrada de Imclone), y el anticuerpo anti-CD20 PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulada "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"). El uso de alemtuzumab, trastuzumab, rituximab, cetuximab, y PRO70769 para propósitos de tamizaje no se pretende que restrinja la presente invención a ningún anticuerpo particular.

Los genes de anticuerpo de cadena ligera (V_L - C_L) y pesada (V_H - $C\gamma 1$ - $C\gamma 2$ - $C\gamma 3$) de longitud completa de IgG1 para alemtuzumab (campath-1H, James y otros, 1999, J Mol Biol 289: 293-301), trastuzumab (hu4D5-8; Carter y otros, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-4289; Gerstner y otros, 2002, J. Mol. Biol., 321: 851-862), rituximab (C2B8, US 6,399,061), y cetuximab (C225, PCT US96/09847) se construyeron mediante el uso de PCR recursiva con sitios de restricción finales convenientes para facilitar la subclonación. Estos genes se ligaron en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1Zeo (Invitrogen), que comprende las regiones constantes de las cadenas ligera kappa (C_k) y pesada de IgG1 de longitud completa. El clon V_H - $C\gamma 1$ - $C\gamma 2$ - $C\gamma 3$ en pcDNA3.1zeo se usó como molde para la mutagénesis de la región Fc. Las mutaciones se introdujeron en este clon mediante el uso de técnicas de mutagénesis basada en PCR o mutagénesis de cambio-rápido (Stratagene). Las variantes de Fc se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la secuencia. Los plásmidos que contienen el gen de cadena pesada (V_H - $C\gamma 1$ - $C\gamma 2$ - $C\gamma 3$) (silvestre o variantes) se co-transfectaron con el plásmido que contiene el gen de cadena ligera (V_L - C_L) en células 293T. El medio se cosechó 5 días después de la transfección. La expresión de inmunoglobulina se controló por el tamizaje del sobrenadante de cultivo de los transfectomas por western mediante el uso de anti-IgG humana de cabra conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Catálogo núm. 109-035-088). La Figura 5 muestra la expresión del alemtuzumab silvestre y las variantes 1 a la 10 en células 293T. Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante mediante el uso de cromatografía de afinidad por proteína A (Pierce, Catálogo núm 20334. La Figura 6 muestra los resultados de la purificación de proteína para el alemtuzumab WT. Las variantes de Fc de los anticuerpos mostraron similares resultados de expresión y purificación al WT. Algunas de las variantes de Fc se deglicosilaron con el fin de determinar su solución y propiedades funcionales en la ausencia de carbohidrato. Para obtener anticuerpos deglicosilados, los anticuerpos alemtuzumab purificados se incubaron con péptido-N-glicosidasa (PNGase F) a 37°C durante 24h. La Figura 7 presenta un gel de SDS PAGE que confirma la deglicosilación para varias de las variantes de Fc y el alemtuzumab WT.

Con el fin de confirmar la fidelidad funcional del alemtuzumab producido bajo estas condiciones, el péptido de CD52 antigénico, fusionado a GST, se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) bajo inducción de IPTG. Ambas muestras no-inducida e inducida se corrieron en un gel de SDS PAGE, y se transfirieron a la membrana de PVDF. Para el análisis western, se usó ya sea alemtuzumab de Sotec (concentración final 2.5ng/ul) o medio de células 293T transfectadas (concentración final de alemtuzumab aproximadamente 0.1-0.2ng/ul) como anticuerpo primario, y anti-IgG humana de carnero conjugado a peroxidasa se usó como anticuerpo secundario. La Figura 8 presenta estos resultados. La habilidad de unir el antígeno objetivo confirma la fidelidad estructural y funcional del alemtuzumab expresado. Las variantes de Fc que tienen la misma región variable que el alemtuzumab WT se anticipa que mantienen una afinidad de unión comparable por el antígeno.

El gen que codifica la región extracelular del Fc γ RIIIa V158 humano se obtuvo por PCR a partir de un clon obtenido de la Colección de Genes de Mamífero (MGC:22630). El Fc γ RIIIa F158 se construyó por mutagénesis del gen Fc γ RIIIa V158. Los genes que codifican las regiones extracelulares del Fc γ RI humano, el Fc γ RIIa humano, el Fc γ RIIb humano, el Fc γ RIIc humano, el Fc γ RIII de ratón, y la cadena α del FcRn humano y la cadena de β -microglobulina se construyeron mediante el uso de PCR recursivo. Los Fc γ R α s y la cadena α del FcRn se fusionaron por el C-terminal con una etiqueta 6x His y una etiqueta GST. Todos los genes se subclonaron en el vector pcDNA3.1 zeo. Para la expresión, los vectores que contenían Fc γ R α s humanos se transfectaron en células 293T, la cadena α del FcRn y la cadena de β -microglobulina se co-transfectaron en células 293T, y el Fc γ RIII de ratón se transfectó en células NIH3T3. El medio que contenía los receptores secretados se cosechó tres días después y se purificó mediante el uso de cromatografía de afinidad de níquel. Para el análisis de western, la membrana se sondeó con un anticuerpo anti-GST. La Figura 9 presenta un gel de

SDS PAGE que muestra los resultados de la expresión y purificación del FcγRIIIa V158 humano. El complejo de proteína C1q humano purificado se adquirió comercialmente (Quidel Corp., San Diego).

Ejemplo 2. Ensayos de unión al ligando de Fc

5 La unión a los ligandos de Fc humanos FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, C1q, y FcRn se midió para las variantes de Fc diseñadas. Las afinidades de unión se midieron mediante el uso de un ensayo AlphaScreen™ (Ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificada (ALPHA), PerkinElmer, Wellesley, MA), un ensayo de proximidad luminiscente basado en perlas. La excitación del láser de una perla donadora excita el oxígeno, que si está
10 suficientemente cerca de la perla aceptora genera una cascada de eventos luminiscentes, que en última instancia conduce a una emisión de fluorescencia a 520-620 nm. El anticuerpo alemtuzumab WT se biotiniló por métodos estándar para su unión a perlas donadoras de estreptavidina, y FcγRs y FcRn etiquetados con GST se unieron a perlas
15ceptoras de quelato glutatión. Para el ensayo de unión a C1 q, la proteína C1q no etiquetada se conjugó con digoxigenina (DIG, Roche) mediante el uso de química de N-hidrosuccinimida (NHS) y se unió a las perlasceptoras de DIG. Para el ensayo de unión a proteína A, las perlasceptoras de proteína A se adquirieron directamente de PerkinElmer. El ensayo AlphaScreen se aplicó como un ensayo de competencia para el tamizaje de las variantes de Fc. En ausencia de variedades de Fc competidoras, el anticuerpo WT y FcγR interactúan y producen una señal a 520-620 nm. La adición de la variante de Fc no etiquetada compite con la interacción Fc WT/FcγR, lo que reduce
20 cuantitativamente la fluorescencia para permitir la determinación de las afinidades de unión relativas. Las variantes de Fc se tamizaron en el contexto de ya sea alemtuzumab o trastuzumab, y las variantes de Fc seleccionadas se tamizaron además en el contexto de rituximab y cetuximab.

La Figura 10 muestra datos de AlphaScreen para la unión al FcγRIIIa V158 humano por las variantes de Fc seleccionadas. Los datos de unión se normalizaron a la máxima y mínima señal de luminiscencia para cada curva particular, proporcionada por la línea de base a bajas y altas concentraciones de anticuerpo respectivamente. Los datos se ajustaron al modelo de competencia de un sitio mediante el uso de regresión no lineal, y estos ajustes se representan por las curvas en la figura. Estos ajustes proporcionan la concentración inhibitoria 50% (IC50) (es decir, la concentración requerida para un 50% de inhibición) para cada anticuerpo, ilustrada por las líneas de puntos en la Figura 10, permitiendo así determinar cuantitativamente las afinidades de unión relativas de las variantes de Fc. Al dividir la IC50
25 de cada variante por la del alemtuzumab WT, se obtiene las veces que mejora o disminuye en relación con el Herceptin WT (Veces el WT). Aquí, el alemtuzumab WT tiene una IC50 de $(4.63 \times 10^{-9}) \times 2 = 9.2$ nM, mientras S239D tiene una IC50 de $(3.98 \times 10^{-10}) \times 2 = 0.8$ nM. Así el alemtuzumab S239D se une 9.2 nM / 0.8 nM = 11.64-veces más fuertemente que el alemtuzumab WT al FcγRIIIa V158 humano. Las Figuras 11 a y 11 b proporcionan los datos de AlphaScreen que muestran las variantes de Fc adicionales, con sustituciones en las posiciones 239, 264, 272, 274, y 332, que se unen
30 más fuertemente al FcγRIIIa, y así son candidatas para mejorar la función efectora de los polipéptidos Fc.

Las variantes de Fc además se tamizaron en paralelo para otros ligandos de Fc. Como se discutió, el receptor inhibitorio FcγRIIb juega un papel importante en la función efectora. Datos ilustrativos para la unión de las variantes de Fc seleccionadas de la invención al FcγRIIb humano, según se midió por AlphaScreen, se proporcionan en la Figura 12. FcγRIIa es un receptor activador que es altamente homólogo a FcγRIIb. Datos ilustrativos para la unión de las variantes de Fc seleccionadas a la forma polimórfica R131 del FcγRIIa humano se proporcionan en la Figura 13. Otro importante ligando de Fc es el receptor de Fc neonatal FcRn. Como se discutió, este receptor se une a la región Fc entre los dominios Cy2 y Cy3; debido a que la unión media el reciclado del endosoma, la afinidad del Fc por FcRn es un determinante fundamental de la farmacocinética del anticuerpo y la fusión de Fc. Datos ilustrativos que muestran la
40 unión de las variantes de Fc seleccionadas al FcRn, según se midió por AlphaScreen, se proporcionan en la Figura 14. El sitio de unión para FcRn en Fc, entre los dominios Cy2 y Cy3, se superpone con el sitio de unión para las proteínas bacterianas A y G. Debido a que la proteína A se emplea frecuentemente para la purificación de anticuerpo, las variantes seleccionadas se probaron para su unión a este ligando de Fc. La Figura 15 proporciona estos datos de AlphaScreen. Aunque la proteína A no se incluyó en el tamizaje en paralelo para todas las variantes, la habilidad de las
45 variantes de Fc de purificarse mediante el uso de cromatografía por proteína A (ver Ejemplo 1) implica que para la mayoría de las variantes de Fc la capacidad de unir proteína A, y además la integridad de la región visagra Cy2-Cy3, no están afectadas por las sustituciones en el Fc.

Los datos para la unión de las variantes de Fc a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, C1q, y FcRn se analizaron como se describió anteriormente para la Figura 11. Las veces que mejora o disminuye la unión de cada variante a cada ligando de Fc en relación al WT, según se midió por AlphaScreen, se proporcionan en la Figura 41. La tabla presenta para cada variante el número de variante (Variante), la sustitución(s) de la variante, el contexto de anticuerpo (Context), las veces la afinidad en relación al WT (Veces) y la confianza (Conf) en las veces la afinidad para unirse a cada ligando de Fc, y el índice de especificidad (IIIa:IIb) (ver más abajo). Se adquirieron múltiples conjuntos de datos de las variantes, y todos los datos para una variante dada se agrupan juntas. El contexto del anticuerpo indica qué anticuerpos se
50 construyeron con la variante de Fc particular ; a = alemtuzumab, t = trastuzumab, r = rituximab, c = cetuximab, y p = PRO70769. Los datos proporcionados se adquirieron en el contexto del primer anticuerpo enumerado, típicamente alemtuzumab, aunque en algunos casos trastuzumab. Un asterisco (*) indica que los datos para los ligandos de Fc se

adquirieron en el contexto del trastuzumab. Una vez (Vez) por encima de 1 indica un aumento en la afinidad de unión, y una vez por debajo de 1 indica una reducción en la afinidad de unión en relación al anticuerpo parental para los ligandos de Fc dados. Los valores de confianza (Conf) corresponden a los niveles de confianza de registro, proporcionados a partir de los ajustes de los datos a una curva dosis-respuesta sigmoideal. Como se conoce en la técnica, un valor de Conf más bajo indica un error más bajo y mayor confianza en el valor Vez. La ausencia de datos para una variante y ligandos de Fc dados indican ya sea que el ajuste a los datos no proporciona un valor significativo, o que la variante no se probó para aquellos ligandos de Fc.

La Figura 41 muestra que se obtuvo un número de variantes de Fc con afinidades mejoradas y especificidades alteradas para los diversos ligandos de Fc. Algunas de las variantes de Fc de la presente invención proporcionan una mejora selectiva en la afinidad de unión a diferentes ligandos de Fc, mientras otras proporcionan una reducción selectiva en la afinidad de unión a diferentes ligandos de Fc. Por "mejora selectiva" como se usa en la presente se entiende una mejora en o una mejora mayor en la afinidad de unión de una variante de Fc a uno o más ligandos de Fc en relación a uno o más de otros ligandos de Fc. Por ejemplo, para una variante dada, Veces el WT para la unión a, dígase FcγRIIIa, puede ser mayor que Veces el WT para la unión a, dígase FcγRIIb. Por "reducción selectiva" como se usa en la presente se entiende una reducción en o una reducción mayor en la afinidad de unión de una variante de Fc a uno o más ligandos de Fc en relación a uno o más de otros ligandos de Fc. Por ejemplo, para una variante dada, Veces el WT para la unión a, dígase FcγRI, puede ser más bajo que las Veces el WT para la unión a, dígase FcγRIIb. Como un ejemplo de tal selectividad, G236S proporciona una mejora selectiva a FcγRII's (IIa, IIb, y IIc) en relación a FcγRI y FcγRIIIa, con una mejora algo mayor a FcγRIIIa en relación a FcγRIIb y FcγRIIc. G236A, sin embargo, es altamente mejorado selectivamente para FcγRIIIa, no solamente con respecto a FcγRI y FcγRIIIa, sino además sobre FcγRIIb y FcγRIIc. Se observan mejoras y reducciones selectivas para un número de variantes de Fc, que incluyen pero sin limitarse a variantes que comprenden sustituciones en los residuos L234, L235, G236, S267, H268, R292, E293, Q295, Y300; S324, A327, L328, A330, y T335. En conjunto, los datos proporcionados en la Figura 41 muestran que de hecho es posible ajustar la región Fc para la especificidad por los ligandos de Fc, frecuentemente mediante el uso de diferencias mutacionales muy sutiles, a pesar del hecho de que un número de receptores altamente homólogos se unen al mismo sitio de unión FcγR. La presente invención proporciona un número de variantes de Fc que se pueden usar para mejorar selectivamente, así como reducir selectivamente, la afinidad de un polipéptido Fc para ciertos ligandos de Fc en relación a otros. Colecciones de variantes de Fc tales como estas no solo permiten la generación de anticuerpos y fusiones de Fc que tienen función efectora adaptada para el resultado deseado, sino además proporcionar un conjunto único de reactivos con los que investigar experimentalmente y caracterizar la función de la biología de la función efectora.

Como se discutió, la función efectora óptima puede resultar de las variantes de Fc en donde la afinidad por los FcγRs activadores es mayor que la afinidad los FcγRIIb inhibidores. De hecho se han obtenido un número de variantes de Fc que muestran una unión mejorada diferencialmente a FcγRIIIa sobre FcγRIIb. Los datos de AlphaScreen que comparan directamente la unión a FcγRIIIa y FcγRIIb para las dos variantes de Fc con este perfil de especificidad, A330L y A330Y, se muestran en las Figuras 16a y 16b. Este concepto se puede definir cuantitativamente como las veces-mejora o reducción del FcγRIIIa activador (Figura 41, columna 12) divididas por las veces-mejora o reducción del FcγRIIb inhibidor (Figura 41, columna 8), en la presente denominado como "índice veces-FcγRIIIa:veces-FcγRIIb" o "índice IIIa:IIb". Este valor se proporciona en la columna 18 de la Figura 41 (como IIIa:IIb). La combinación de A330L y A330Y con otras variantes, por ejemplo A330L/I332E, A330Y/I332, y S239D/A330L/I332E, proporciona índices IIIa:IIb muy favorables. La Figura 41 muestra que un número de las variantes de Fc proporcionan un perfil de especificidad positivo, favorable FcγRIIIa a FcγRIIb, con un índice IIIa:IIb tan alto como 86:1.

Algunas de las variantes de Fc más prometedoras de la presente invención para mejorar la función efectora tienen tanto aumentos sustanciales en la afinidad por FcγRIIIa como índices veces-FcγRIIIa:veces-FcγRIIb favorables. Estas incluyen, por ejemplo, S239D/I332E (veces-FcγRIIIa = 56 - 192, veces-FcγRIIIa:veces-FcγRIIb = 3), S239D/A330Y/I332E (veces-FcγRIIIa = 130), S239D/A330L/I332E (veces-FcγRIIIa = 139, veces-FcγRIIIa:veces-FcγRIIb = 18), y S239D/S298A/I332E (veces-FcγRIIIa = 295, veces-FcγRIIIa:veces-FcγRIIb = 48). Las Figuras 17a -17c muestran datos de AlphaScreen controlando la unión de estas y otras variantes de Fc en el contexto de trastuzumab a FcγRIIIa V158 humano y FcγRIIb humano.

Adicionalmente a alemtuzumab y trastuzumab, las variantes de Fc seleccionadas se tamizaron en el contexto de otros anticuerpos con el fin de investigar la amplitud de su aplicabilidad. Los datos de AlphaScreen que miden la unión de las variantes de Fc seleccionadas a FcγRIIIa V158 humano en el contexto de rituximab y cetuximab se muestran en la Figura 18 y Figura 19 respectivamente. Junto con los datos mostrados previamente para alemtuzumab y trastuzumab, los resultados indican consistentes aumentos de la unión independientemente del contexto de anticuerpo, y así que las variantes de Fc de la presente invención son ampliamente aplicables a anticuerpos y fusiones de Fc.

Como se discutió anteriormente, un parámetro importante de la función efectora mediada por Fc es la afinidad de Fc por ambas formas polimórficas V158 y F158 de FcγRIIIa. Los datos de AlphaScreen que comparan la unión de las variantes seleccionadas a los dos alotipos del receptor se muestran en la Figura 20a (FcγRIIIa V158) y la Figura 20b (FcγRIIIa

F158). Como se puede ver, todas las variantes mejoran la unión a ambos alotipos de FcγRIIIa. Estos datos indican que aquellas variantes de Fc de la presente invención con función efectora mejorada serán ampliamente aplicables a la población entera de pacientes, y que la mejora para la eficacia clínica potencialmente será máxima para la población baja respondedora de pacientes que lo necesitan más.

Las afinidades de unión al FcγR de estas variantes de Fc se investigaron adicionalmente mediante el uso de Resonancia de Plasmones de Superficie (SPR) (Biacore, Uppsala, Suecia). SPR es un método sensible y extremadamente cuantitativo que permite la medición de las afinidades de unión de las interacciones proteína-proteína, y se ha usado para medir efectivamente la unión Fc/FcγR (Radaev y otros, 2001, J Biol Chem 276:16478-16483). SPR así proporciona un ensayo de unión excelente complementario al ensayo AlphaScreen. El FcγRIIIa V158 etiquetado con His se inmovilizó a un chip de SPR, y anticuerpos alemtuzumab WT y las variante de Fc fluyeron sobre el chip en un intervalo de concentraciones. Las constantes de unión se obtuvieron a partir de ajustar los datos mediante el uso de métodos estándar de ajuste de curva. La Tabla 3 presenta las constantes de disociación (Kd) para la unión de las variantes de Fc seleccionadas a FcγRIIIa V158 y FcγRIIIa F158 obtenidas mediante el uso de SPR, y compara estas con las IC50s obtenidas del ensayo AlphaScreen. Al dividir la Kd y la IC50 para cada variante por la del alemtuzumab WT, se obtienen las veces-mejoras sobre el WT (Veces WT).

Tabla 3

	SPR FcγRIIIa V158		SPR FcγRIII F158		AlphaScreen FcγRIIIa V158		AlphaScreen FcγRIIIa F158	
	KD (nM)	veces WT	KD (nM)	veces WT	IC50 (nM)	veces WT	IC50 (nM)	veces WT
Tipo silvestre	68		730		6.4		17.2	
V2641	64	1.1	550	1.3	4.5	1.4	11.5	1.5
I332E	31	2.2	72	10.1	1.0	6.4	2.5	6.9
V264I/I332E	17	4.0	52	14.0	0.5	12.8	1.1	15.6
S298A	52	1.3	285	2.6	2.9	2.2	12.0	1.4
S298A/E333A/K334A	39	1.7	156	4.7	2.5	2.6	7.5	2.3

Los datos de SPR corroboran las mejoras a la afinidad de FcγRIIIa observadas por el ensayo AlphaScreen. La Tabla 3 indica más aun la superioridad de V264I/I332E y I332E sobre S298A y S298A/E333A/K334A; mientras S298A/E333A/K334A mejora la unión de Fc a V158 y FcγRIIIa F158 en 1.7-veces y 4.7-veces respectivamente, I332E muestra mejoras en la unión de 2.2-veces y 10.1-veces respectivamente, y V264I/I332E muestra mejoras en la unión de 4.0-veces y 14-veces respectivamente. Además es notable que la afinidad de V264I/I332E por el FcγRIIIa F158(52 nM) es mejor que aquella del WT por el alotipo V158 (68 nM), lo que sugiere que esta variante de Fc, así como aquellas con incluso mayores mejoras en la unión, puede posibilitar la eficacia clínica de anticuerpos de forma que la población de pacientes bajos respondedores alcance lo que es actualmente posible para los altos respondedores. La correlación entre las mediciones de unión de SPR y AlphaScreen se muestra en las Figuras 21a - 21d. Las Figuras 21a y 21b muestran las correlaciones Kd - IC50 para la unión a FcγRIIIa V158 y FcγRIIIa F158 respectivamente, y las Figuras 21c y 21d muestran las correlaciones veces-mejora para la unión a FcγRIIIa V158 y FcγRIIIa F158 respectivamente. Los buenos ajustes de estos datos a líneas rectas ($r^2 = 0.9$, $r^2 = 0.84$, $r^2 = 0.98$, y $r^2 = 0.90$) soportan la exactitud de las mediciones AlphaScreen, y valida su uso para la determinación de las afinidades de unión relativas de las variantes de Fc.

Los datos de SPR se adquirieron además para la unión de las variantes de Fc de trastuzumab seleccionadas a FcγRIIIa V158 humano, FcγRIIIa F158, y FcγRIIb. Estos datos se muestran en la Tabla 4. Las variantes de Fc probadas muestran substanciales mejoras en la unión al receptor activador FcγRIIIa, con una unión 100-veces más firme observada para las interacciones de S239D/I332E/S298A con FcγRIIIa F158. Además, para los mejores enlazadores de FcγRIIIa, se observan índices FcγRIIIa F158/FcγRIIb de 3 - 4.

Tabla 4

	SPR FcγRIIIa V158		SPR FcγRIIIa F158		SPR FcγRIIb	
	KD (nM)	veces WT	KD (nM)	veces WT	IC50 (nM)	veces WT
Tipo silvestre	363.5		503		769	
V264I/I332E	76.9	4.7	252	2.0	756	1.0
V264I/I332E/ A330L	113.0	3.2	88	5.7	353	2.2
S239D/I332E/ A330L	8.2	44.3	8.9	56.5	46	16.7
S239D/I332E/ S298A	8.7	41.8	4.9	102.7	32	24.0
S239D/I332E/ V264I/A330L	12.7	28.6	6.3	79.8	35	22.0

Como se discutió, aunque se necesita una mayor función efectora, para algunos anticuerpos terapéuticos, puede ser deseable reducir o eliminar la función efectora. Varias variantes de Fc en la Figura 41 sustancialmente reducen o eliminan la unión al FcγR, y así pueden encontrar uso en anticuerpos y fusiones de Fc en donde la función efectora es indeseable. Los datos de AlphaScreen de las mediciones de la unión de algunas variantes de Fc ilustrativas al FcγRIIIa V158 humano se muestran en las Figuras 22a y 22b. Estas variantes de Fc, así como su uso en combinación, pueden encontrar uso para la eliminación de la función efectora cuando se desea, por ejemplo en anticuerpos y fusiones de Fc cuyos mecanismos de acción involucran el boqueo o antagonismo pero no la muerte de las células que portan el antígeno objetivo. Basado en los datos proporcionados en la Figura 41, las posiciones preferidas para reducir la unión de los ligandos de Fc y/o la función efectora, que son las posiciones que se pueden modificar para reducir la unión a uno o más ligandos de Fc y/o reducir la función efectora, incluyen pero sin limitarse a las posiciones 232, 234, 235, 236, 237, 239, 264, 265, 267, 269, 270, 299, 325, 328, 329, y 330.

Ejemplo 3. ADCC de variantes de Fc

Con el fin de determinar el efecto sobre la función efectora, se realizaron ensayos de ADCC basados en células en variantes de Fc seleccionadas. La ADCC se midió mediante el uso del ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA) con monocitos de sangre humana periférica (PBMC) purificados como células efectoras. Las células objetivo se cargaron con BATDA a 1×10^6 células/ml, se lavaron 4 veces y se sembraron en placa de 96 pocillos a 10,000 células/pocillo. Después las células objetivo se osonizaron mediante el uso de anticuerpos de tipo silvestre o con variantes de Fc a la concentración final indicada. Los PBMC humanos, aislados a partir de la capa leucocitaria se adicionaron a las veces en exceso indicadas de células objetivo y la placa se incubó a 37°C durante 4 horas. Las células co-cultivadas se centrifugaron a 500xg, los sobrenadantes se transfirieron a una placa separada y se incubaron con solución Eu, y se midieron las unidades de fluorescencia relativa mediante el uso de un lector Fusion™ α-FP HT de Packard (Packard Biosciences, IL). Las muestras se realizaron por triplicado para proporcionar estimaciones de error (n=3, +/- D.S.). Se determinó el alotipo de los PBMC para el alotipo de FcγRIIIa V158 o F158 mediante el uso de la PCR.

Los ensayos de ADCC se realizaron en alemtuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc mediante el uso de células objetivo DoHH-2 de linfoma. La Figura 23a es un gráfico de barras que muestra la ADCC de estas proteínas a 10 ng/ml de anticuerpo. Los resultados muestran que las variantes de Fc I332E, V264I, y I332E/V264I de alemtuzumab tienen ADCC sustancialmente mejorada en comparación con el alemtuzumab de tipo silvestre, con las mejoras relativas de la ADCC proporcionales a sus mejoras en la unión a FcγRIIIa como se indica mediante el ensayo AlphaScreen y SPR. La dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpo se muestra en la Figura 23b. Los datos de unión se normalizaron con respecto a la señal de fluorescencia mínima y máxima para cada curva particular, proporcionada por las líneas de referencia a concentraciones de anticuerpo bajas y altas respectivamente. Los datos se ajustaron a un modelo sigmoidal de dosis-respuesta mediante el uso de regresión no lineal, representado por la curva en la figura. El ajuste permite la determinación de la concentración eficaz al 50% (EC50) (es decir la concentración requerida para 50% de eficacia), que proporciona las mejoras relativas a la ADCC para cada variante de Fc. Las EC50 para estos datos de unión son análogas a las IC50 obtenidas a partir de los datos de competencia de AlphaScreen, y la derivación de estos valores es por lo tanto análoga a la descrita en el Ejemplo 2 y la Figura 11. En la Figura 23b, los log(EC50), obtenidos a partir de los ajustes a los datos, para el alemtuzumab de tipo silvestre, V264I/I332E, y S239D/I332E son 0.99, 0.60, y 0.49 respectivamente, y por lo tanto sus EC50 respectivas son 9.9, 4.0, y 3.0. Por lo tanto V264I/I332E y S239E/I332E proporcionan una mejora de 2.5 veces y 3.3 veces respectivamente en la ADCC sobre el alemtuzumab de tipo silvestre que usa PBMC que expresan FcγRIIIa heterocigotos V158/F158. Estos datos se resumen en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	WT veces
Tipo silvestre	0.99	9.9	
V264I/I332E	0.60	4.0	2.5
S239D/I332E	0.49	3.0	3.3

Con el fin de determinar si estas mejoras en la ADCC son ampliamente aplicables a los anticuerpos, se evaluaron variantes de Fc seleccionadas en el contexto del trastuzumab y del rituximab. Los ensayos de ADCC se realizaron en trastuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc mediante el uso de las líneas celulares objetivas de carcinoma de mama BT474 y Sk-Br-3. La Figura 24a muestra un gráfico de barras que ilustra la ADCC a 1 ng/ml de anticuerpo. Los resultados indican que el trastuzumab V264I y el V264I/I332E proporcionan ADCC sustancialmente mejorada en comparación con el trastuzumab de tipo silvestre, con las mejoras relativas de la ADCC proporcionales a sus mejoras en la unión a FcγR111a como se indica mediante el ensayo AlphaScreen y SPR. Las Figuras 24b y 24c muestran la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpo para variantes de Fc seleccionadas. Las EC50 obtenidas a partir de los ajustes de estos datos y las mejoras relativas en veces en la ADCC se proporcionan en la Tabla 6 más abajo. Se observan mejoras significativas de la ADCC para el trastuzumab I332E cuando se combina con A330L y A330Y. Además, S239D/A330L/I332E proporciona una mejora sustancial de la ADCC, mayor que 300 veces para los PBMC que expresan FcγR111a homocigotos F158/F158, con relación al trastuzumab de tipo silvestre y el S298A/E333A/K334A, consistente con los datos de unión a FcγR observados mediante el ensayo AlphaScreen y SPR.

Tabla 6

	log(EC50) I	EC50 (ng/ml)	Veces WT
Figura 24b			
Tipo silvestre	1.1	11.5	
I332E	0.34	2.2	5.2
A330Y/I332E	-0.04	0.9	12.8
A330L/I332E	0.04	1.1	10.5
Figura 24c			
Tipo silvestre	-0.15	0.71	
S298A/E333AK334A/	-0.72	0.20	3.6
S239D/A330LI332E/	-2.65	0.0022	323

Los ensayos de ADCC se realizaron en rituximab V264I/I332E, de tipo silvestre, y S298A/D333A/K334A mediante el uso de células objetivas WIL2-S de linfoma. La Figura 25a presenta un gráfico de barras que muestra la ADCC de estas proteínas a 1 ng/ml de anticuerpo. Los resultados indican que el rituximab V264I/I332E proporciona ADCC sustancialmente mejorada con relación al rituximab de tipo silvestre, así como ADCC superior a S298A/D333A/K334A, consistente con las mejoras en la unión a FcγR111a observadas mediante el ensayo AlphaScreen y SPR. Las Figuras 25b y 25c muestran la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpo para variantes de Fc seleccionadas. Las EC50 obtenidas a partir de los ajustes de estos datos y las mejoras relativas en veces en la ADCC se proporcionan en la Tabla 7 más abajo. Como puede observarse el rituximab S239D/I332E/A330L proporciona una mejora mayor que 900 veces en la EC50 sobre el tipo silvestre para PBMC que expresan FcγR111a homocigotos F158/F158. Las diferencias en las mejoras de la ADCC observadas para alemtuzumab, trastuzumab, y rituximab se deben probablemente al uso de diferentes PBMC, diferentes anticuerpos, y diferentes líneas celulares objetivas.

Tabla 7

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	Veces WT
Figura 25b			
Tipo silvestre	0.23	1.7	
S298A/E333AK334A/	-0.44	0.37	4.6
V264I/I332E	-0.83	0.15	11.3
Figura 25c			
Tipo silvestre	0.77	5.9	
S239D/I332EA330L/	-2.20	0.0063	937

Hasta aquí, los datos de la ADCC se han normalizado de tal manera que las líneas de referencia inferior y superior de cada polipéptido Fc se ajustan a la señal de fluorescencia mínima y máxima para ese polipéptido Fc específico, que es típicamente la señal de fluorescencia a las concentraciones de anticuerpo más baja y más alta respectivamente. Aunque presentar los datos en esta materia permite una comparación visual directa de las EC50 relativas de diferentes anticuerpos (de ahí la razón para presentarlos de esta manera), se pierde información importante con respecto al nivel absoluto de función efectora alcanzado por cada polipéptido Fc. Las Figuras 26a y 27b presentan los datos de ADCC basada en células para trastuzumab y rituximab respectivamente que se han normalizado de acuerdo con la lisis mínima absoluta para el ensayo, proporcionada por la señal de fluorescencia de las células objetivos en presencia de PBMC solos (sin anticuerpo), y la lisis máxima absoluta para el ensayo, proporcionada por la señal de fluorescencia de las células objetivos en presencia de Tritón X1000. Los gráficos muestran que los anticuerpos no sólo difieren en sus EC50, que reflejan sus potencias relativas, sino también en el nivel máximo de la ADCC alcanzable por los anticuerpos a concentraciones de saturación, que refleja sus eficacias relativas. Hasta aquí estos dos términos, potencia y eficacia, se han usado libremente para referirse a las propiedades clínicas deseadas. En el presente contexto experimental, sin embargo, estos se denotan como cantidades específicas, y por lo tanto se definen explícitamente a continuación. Por "potencia" como se usa en el presente contexto experimental se entiende la EC50 de un polipéptido Fc. Por "eficacia" como se usa en el presente contexto experimental se entiende la máxima función efectora posible de un polipéptido Fc a niveles de saturación. Además de las mejoras sustanciales a la potencia descritas hasta aquí, las Figuras 26a y 26b muestran que las variantes de Fc de la presente solicitud proporcionan mejoras mayores que 100% en la eficacia sobre el trastuzumab y el rituximab de tipo silvestre.

Ejemplo 4. Validación cruzada de las variantes de Fc

Variantes de Fc seleccionadas se validaron para su unión a FcγR y las mejoras en la ADCC en el contexto de dos anticuerpos - alemtuzumab y trastuzumab. La unión a FcγRIIIa V158 humano se midió mediante el uso de AlphaScreen y SPR como se describió anteriormente. Los datos de AlphaScreen ilustrativos que miden la unión a FcγRIIIa se proporcionan en la Figura 27. La ADCC se llevó a cabo en el contexto del trastuzumab mediante el uso de células objetivos Sk-Br-3 y la detección de LDH como se describió anteriormente. Los datos de ADCC ilustrativos se proporcionan en la Figura 28. La Tabla 8 proporciona un resumen de las afinidades de unión a FcγRIIIa en veces con relación al tipo silvestre como se determinó mediante AlphaScreen y SPR, y la ADCC en veces con relación al tipo silvestre para una serie de variantes de Fc en el contexto del alemtuzumab (alem) y el trastuzumab (trast).

Tabla 8

Sustitución de la variante	Variante Número	Contexto	Veces WT V158 FcγRIIIa		
			AlphaScreen	SPR	ADCC
G236S	719	trast	2.78	1.34	0.37
G236S	719	alem	6.22	6.69	
S239E	43	trast	29.99	4.17	7.6
S239E	43	alem	2.64	3.28	
S239D	86	trast	16.9	3.5	6.1
S239D	86	alem	36.56	16.61	

ES 2 530 340 T3

	K246H	812	trast	17.91	2.67	2
5	K246H	812	alem	13.58	22.36	
	K246Y	813	trast	17.44	2.39	1.36
	K246Y	813	alem	4.32	7.07	
10	R255Y	818	trast	21.14	2.75	1.6
	R255Y	818	alem	0.92	1.41	
	E258H	820	trast	1.18	0.77	0.76
15	E258H	820	alem	2.35	5.5	
	E258Y	821	trast	2.82	1.69	0.92
	E258Y	821	alem	0.64	1.77	
20	T260H	824	trast	35.32	2.82	
	T260H	824	alem	1	1.86	
	S267E	338	alem	9.33	2.62	
25	H268D	350	trast	45.27	4.76	4.59
	H268D	350	alem	10.55	5.66	
	E272I	237	trast	5.86	1.63	1.38
30	E272I	237	trast	3.24	1.99	
	E272R	634	alem		1.38	
	E272H	636	trast	1.02	0.65	1.28
	E272H	636	alem	187.1	383.88	
35	E272P	642	trast	0.005	0.522	0.39
	E272P	642	alem	1.46	1.41	
	E283H	839	trast	0.99	0.71	1.4
40	E283H	839	alem		2.31	
	E283L	840	trast	19.88	3.68	5.2
	E283L	840	alem	1.36	2.56	
45	V284E	844	trast	2.82	1.26	0.84
	V284E	844	alem		1.51	
	E293R	555	trast	1.15	0.94	0.47
50	S298D	364	trast	3.48	1.49	0.58
	S304T	879	trast	6.33	1.65	1.02
	S304T	879	alem		12.85	
	S324I	267	trast	5.26	1.46	2.21
55	S324G	608	trast	3.04	1.76	3.23
	S324G	608	alem	13.62	14.17	

60

5	K326E	103	trast	6.12	2.12	2.87
	K326E	103	alem	1.86	3.13	
	A327D	274	trast	2.44	1.31	1.04
	I332E	22	trast			
10	I332D	62	trast	19	2.57	5
	I332D	62	alem	21.65	11.16	
	E333Y	284	trast	8.24	1.94	2.23
15	K334I	285	trast	15.24	7.1	1.2
	K334T	286	trast	15.73	6.79	3.14
	K334F	287	trast	10.46	5.82	1.92

20 Ejemplo 5 ADCC a niveles de expresión variables de antígeno objetivo

Un parámetro fundamental que gobierna la eficacia clínica de los anticuerpos contra el cáncer es el nivel de expresión del antígeno objetivo sobre la superficie de las células tumorales. Por lo tanto una ventaja clínica importante de las variantes de Fc que mejoran la ADCC puede ser que permiten la orientación a tumores que expresan niveles más bajos de antígeno. Con el fin de probar esta hipótesis, se probaron anticuerpos trastuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc para su capacidad de mediar la ADCC contra diferentes líneas celulares que expresan niveles variables del antígeno objetivo Her2/neu mediante el uso del método EuTDA DELFIA. Se usaron cuatro líneas celulares que expresan niveles de amplificados a bajos del receptor Her2/neu, que incluyen Sk-Br-3 (1×10^6 copias), SkOV3 ($\sim 1 \times 10^5$), OVCAR3 ($\sim 1 \times 10^4$), y MCF-7 ($\sim 3 \times 10^3$ copias) (Figura 29a). Las células objetivos se cargaron con BATDA en batch durante 25 minutos, se lavaron múltiples veces con medio y se sembraron a 10,000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. Las células objetivos se opsonizaron durante 15 minutos con varios anticuerpos y concentraciones (conc. final en el intervalo de 100 ng/ml a .0316 ng/ml en las etapas de $\frac{1}{2}$ log, que incluyen control sin tratamiento). Después los PBMC humanos, aislados a partir de la capa leucocitaria y alotipados como Fc γ R1IIa homocigotos F158/F158 se adicionaron a las células opsonizadas en un exceso de 25 veces y se co-cultivaron a 37°C durante 4 horas. Después, las placas se centrifugaron, los sobrenadantes se retiraron y se trataron con solución Eu3+, y se midieron las unidades de fluorescencia relativa (que se correlacionan con el nivel de lisis celular) mediante el uso de un lector Fusion™ α -FP HT de Packard (PerkinElmer, Boston, MA). El experimento se llevó a cabo por triplicado. La Figura 29b muestra los datos de ADCC que comparan el trastuzumab de tipo silvestre y con variante de Fc contra las cuatro líneas celulares Her2/neu⁺ diferentes. Las variantes S239D/I332E y S239D/I332E/A330L proporcionan mejoras sustanciales de la ADCC sobre el trastuzumab de tipo silvestre a niveles de expresión de antígeno objetivo altos, moderados, y bajos. Este resultado sugiere que las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ampliar la ventana terapéutica de los anticuerpos contra el cáncer.

45 Ejemplo 6. ADCC con células NK como células efectoras

Las células asesinas naturales (NK) son una subpoblación de células presente en los PBMC que se cree que juegan un papel significativo en la ADCC. Se probaron variantes de Fc seleccionadas en un ensayo de ADCC basado en células en el cual se usaron células asesinas naturales (NK) en lugar de PBMC como células efectoras. En este ensayo se usó la liberación de lactosa deshidrogenasa (LDH) endógena, en lugar de EuTDA, para monitorear la lisis celular. La Figura 30 muestra que las variantes de Fc muestran mejora sustancial de la ADCC cuando se usan células NK como células efectoras. Además, junto con los ensayos anteriores, los resultados indican que las variantes de Fc de la presente solicitud muestran mejoras sustanciales de la ADCC independientemente del tipo de célula efectora o del método de detección usado.

55 Ejemplo 7. ADCP de variantes de Fc

Otra función efectora importante mediada por Fc γ R es la ADCP. La fagocitosis de células cancerosas objetivo puede no sólo conducir a la destrucción inmediata de las células objetivos, sino que debido a que la fagocitosis es un mecanismo potencial para la captación de antígeno y el procesamiento por células presentadoras de antígeno, la mejora de la ADCP también puede mejorar la capacidad del polipéptido Fc de provocar una respuesta inmune adaptativa. Por lo tanto se investigó la capacidad de las variantes de Fc de la presente solicitud de mediar la ADCP. Los monocitos se aislaron a partir de PBMC con Fc γ R1IIa heterocigotos V158/F158 mediante el uso de un gradiente de Percoll. Después de una semana en cultivo en presencia de 0.1 ng/ml, los macrófagos diferenciados se desprendieron con EDTA/PBS y

se marcaron con el fluoróforo lipófilico, PKH26, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Sigma, St Louis, Mo). Las células objetivas Sk-Br-3 se marcaron con PKH67 (Sigma, St Louis, Mo), se sembraron en una placa de 96 pocillos a 20,000 células por pocillo, y se trataron con las concentraciones finales designadas de trastuzumab de tipo silvestre o con variantes de Fc. Después los macrófagos marcados con PKH26 se adicionaron a las células opsonizadas, marcadas con Sk-Br-3 a 20,000 células por pocillo y las células se co-cultivaron durante 18 horas antes de procesar las células para el análisis de citometría de flujo con doble marcaje. El por ciento de fagocitosis se determinó como el número de células co-marcadas con PKH76 y PKH26 (macrófago + Sk-Br-3) sobre el número total de Sk-Br-3 en la población (fagocitadas + no fagocitadas) después de 10,000 conteos. La Figura 31 muestra los datos que comparan el trastuzumab de tipo silvestre y con variante de Fc a varias concentraciones de anticuerpo. Los resultados indican que la variante S239D/I332E/A330L proporciona una mejora significativa en la ADCP sobre el trastuzumab de tipo silvestre.

Ejemplo 8. Unión al complemento y activación por variantes de Fc

La proteína del complemento C1q se une a un sitio en Fc que es proximal al sitio de unión del FcγR, y por lo tanto era prudente determinar si las variantes de Fc han mantenido su capacidad de reclutar y activar el complemento. El ensayo AlphaScreen se usó para medir la unión de las variantes de Fc seleccionadas a la proteína del complemento C1q. El ensayo se llevó a cabo con anticuerpo alemtuzumab de tipo silvestre biotinilado unido a perlas donantes de estreptavidina como se describe en el Ejemplo 2, y mediante el uso de C1q acoplada directamente a perlasceptoras. Los datos de unión de rituximab V264I, I332E, S239E, y V264I/I332E mostrados en la Figura 32a indican que la unión a C1q no está comprometida. Además se realizaron ensayos de CDC basados en células en variantes de Fc seleccionadas para investigar si las variantes de Fc mantienen la capacidad de activar el complemento. Se usó Alamar Azul para monitorear la lisis por el complemento del suero humano de las células WIL2-S de linfoma opsonizadas con rituximab de tipo silvestre y con variantes de Fc (Quidel, San Diego, CA). Los datos en la Figura 32b muestran que la CDC no está comprometida para el rituximab con las variantes de Fc S239E, V264I, y V264I/I332E. En contraste, la Figura 32c muestra que se produce ablación completa de la CDC de la variante de Fc S239D/I332E/A330L, mientras que la variante S239D/I332E media la CDC que es comparable a la del rituximab de tipo silvestre. Estos resultados indican que la modificación de proteínas puede ser usada para distinguir entre funciones efectoras diferentes. Tal control no sólo permitirá la generación de polipéptidos Fc, que incluyen anticuerpos y fusiones Fc, con propiedades adaptadas a un resultado clínico deseado, sino que también proporciona un conjunto de reactivos único para investigar experimentalmente la biología de la función efectora.

Ejemplo 9. Mejora de la reducción de células B en macacos

Con el fin de evaluar la capacidad de las variantes de Fc de mejorar la función efectora *in vivo*, se llevó a cabo un estudio preclínico en donde se usó la reducción de células B para medir la citotoxicidad por anticuerpos en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*). Tres monos por muestra se inyectaron por vía intravenosa con el anticuerpo rituximab de tipo silvestre o S239D/I332E, con inyecciones administradas una vez al día durante 1-4 días en intervalos de dosis aproximadas de 40 µg/kg (control de tipo silvestre) o 1, 4, 10, o 40 µg/kg (S239D/I332E y/o de tipo silvestre). Las concentraciones reales se determinaron experimentalmente. Los niveles de células B y células asesinas naturales se monitorearon de los días 5 al 28, y las poblaciones celulares se contaron mediante el uso de citometría de flujo usando los marcadores de células B CD20+ y CD40+, y los marcadores de células asesinas naturales CD3-/CD16+ y CD3-/CD8+.

La Figura 33a muestra el por ciento de células B CD20+ restantes en monos dosificados con anticuerpos que comprenden rituximab de tipo silvestre o S239D/I332E. La variante S239D/I332E y el control de tipo silvestre a la dosificación más baja (1.8 y 2.1 µg/kg) muestran la mayor diferencia en los conteos de células B en el día 5. Las poblaciones de células NK se monitorearon para evaluar el impacto de la mejora de la función efectora en este tipo celular; la Figura 33b muestra que el aumento de las muertes de células B CD20+ de la variante S239D/I332E no afecta la población de células asesinas naturales. La reducción en el nivel de células B es además dependiente de la dosis, como se muestra en la Figura 33c para el día 5.

Ejemplo 10. Capacidad para la prueba de variantes de Fc en ratones

La optimización de Fc a FcγR no humanos puede ser útil para probar experimentalmente variantes de Fc en modelos animales. Por ejemplo, cuando se prueban en ratones (por ejemplo ratones desnudos, ratones SCID, ratones con xenoinjerto, y/o ratones transgénicos), anticuerpos y fusiones Fc que comprenden variantes de Fc que están optimizadas para uno o más FcγR de ratón pueden proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia clínica, el mecanismo de acción, y similares. Con el fin de evaluar si las variantes de Fc de la presente solicitud pueden ser útiles en dichos experimentos, se midió la afinidad de variantes de Fc seleccionadas para FcγRII de ratón mediante el uso del ensayo AlphaScreen. El ensayo AlphaScreen se llevó a cabo mediante el uso de alemtuzumab de tipo silvestre biotinilado unido a perlas donantes de estreptavidina como se describe en el Ejemplo 2, y FcγRIII de ratón etiquetado con GST unido a perlasceptoras de quelatos de glutatión, expresado y purificado como se describe en el Ejemplo 2. Estos datos de unión se muestran en la Figura 34a para las variantes de Fc en el contexto del alemtuzumab, y en las

Figuras 34b y 34c en el contexto del trastuzumab. Los resultados muestran que algunas variantes de Fc que mejoran la unión a FcγRIIIa humano también mejoran la unión a FcγRIII de ratón. La mejora de la función efectora en ratón por las variantes de Fc se investigó al realizar los ensayos de ADCC basados en células anteriormente mencionados mediante el uso de PBMC de ratón en lugar de humanos. La Figura 35 muestra que la variante de trastuzumab S239D/I332E/A330L proporciona mejora sustancial de la ADCC sobre el tipo silvestre en presencia de células inmunes de ratón. Este resultado indica que las variantes de Fc de la presente solicitud, u otras variantes de Fc que se optimizan para FcγR no humanos, pueden encontrar uso en experimentos que usan modelos animales.

Ejemplo 11. Validación de variantes de Fc expresadas en células CHO

Mientras que las variantes de Fc de la presente solicitud se expresaron en células 293T con fines de tamizaje, la producción de anticuerpos a gran escala se lleva a cabo típicamente mediante la expresión en líneas celulares de Ovario de Hamster Chino (CHO). Con el fin de evaluar las propiedades de variantes de Fc expresadas en CHO, alemtuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc seleccionadas se expresaron en células CHO y se purificaron como se describe en el Ejemplo 1. La Figura 36 muestra los datos de AlphaScreen que comparan la unión a FcγRIIIa V158 humano de alemtuzumab de tipo silvestre y con variantes de Fc expresados en CHO y 293T. Los resultados indican que las variantes de Fc de la presente solicitud muestran mejoras en la unión a FcγR comparables ya sean expresadas en 293T o CHO.

Ejemplo 12. Mejora de variantes de Fc en cepa fucosa menos

Las combinaciones de las variantes de Fc con otras modificaciones de Fc se contemplan con el objetivo de generar nuevos polipéptidos Fc con propiedades optimizadas. Puede ser beneficioso combinar las variantes de Fc de la presente solicitud con otras modificaciones de Fc, que incluyen modificaciones que alteran la función efectora o la interacción con uno o más ligandos de Fc. Dicha combinación puede proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas, o nuevas en polipéptidos Fc. Por ejemplo, existe una serie de métodos para modificar diferentes glicofomas de Fc que alteran la función efectora. Las glicofomas modificadas pueden generarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, muchas de estas técnicas se basan en el control del nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisecados que están unidos covalentemente a la región Fc. Un método para modificar glicofomas de Fc es expresar el polipéptido Fc en una línea celular que genera glicofomas alteradas, por ejemplo células CHO Lec-13. Con el fin de investigar las propiedades de las variantes de Fc combinadas con glicofomas modificadas, se expresaron trastuzumab de tipo silvestre y V209 (S239D/I332E/A330L) en células CHO Lec-13 y se purificaron como se describió anteriormente. La Figura 37a muestra los datos de unión de AlphaScreen que comparan la unión al FcγRIIIa V158 humano por trastuzumab de tipo silvestre y V209 expresados en células 293T, CHO, y Lec-13. Los resultados muestran que hay sinergismo sustancial entre las glicofomas modificadas producidas por esta línea celular y las variantes de Fc de la presente solicitud. El ensayo de ADCC basado en células, mostrado en la Figura 37b, apoya este resultado. En conjunto estos datos indican que otras modificaciones de Fc, particularmente las glicofomas modificadas, pueden combinarse con las variantes de Fc de la presente solicitud para generar polipéptidos Fc, por ejemplo anticuerpos y fusiones Fc, con funciones efectoras optimizadas.

Ejemplo 13. Variantes de Fc aglicosiladas

Como se discutió, un objetivo de los presentes experimentos fue obtener variantes de Fc aglicosiladas optimizadas. Diversas variantes de Fc proporcionan un progreso significativo hacia este objetivo. Debido a que es el sitio de glicosilación, la sustitución en N297 resulta en un Fc aglicosilado. Mientras que en todas las otras variantes de Fc que comprenden una sustitución en N297 se produce la ablación completa de la unión a FcγR, N297D/I332E tiene afinidad de unión significativa por FcγRIIIa, mostrada en la Figura 41 e ilustrada en la Figura 38. La razón exacta para este resultado es incierta en ausencia de una estructura de alta resolución para esta variante, aunque las predicciones de tamizaje computacional sugieren que se debe potencialmente a una combinación de nuevas interacciones Fc/FcγR y propiedades electrostáticas favorables. De hecho otras sustituciones electrostáticas se prevén para la optimización adicional de Fc aglicosilado. La Figura 41 muestra que otras variantes de Fc aglicosiladas tales como N297D/A330Y/I332E y S239D/N297D/I332E proporcionan mejoras en la unión que llevan la afinidad por FcγRIIIa dentro de tanto como 0.4- y 0.8- respectivamente del alemtuzumab de tipo silvestre glicosilado. Se contemplan combinaciones de estas variantes con otras variantes de Fc que mejoran la unión a FcγR, con el objetivo de obtener variantes de Fc aglicosiladas que se unan a uno o más FcγR con afinidad que sea aproximadamente la misma o incluso mejor que el Fc glicosilado parental. Las variantes de Fc preferidas para mejorar la unión del ligando y/o la función efectora en una polipéptido Fc aglicosilado incluyen pero sin limitarse a: N297D, N297D/I332E, N297D/I332D, S239D/N297D, S239D/N297D/I332E, N297D/A330Y/I332E, y S239D/N297D/A330Y/I332E. La presente invención por supuesto contempla combinaciones de estas variantes aglicosiladas con otras variantes de Fc descritas en la presente descripción que también mejoran la unión al ligando y/o la función efectora de Fc.

Un conjunto adicional de variantes de Fc prometedoras proporcionan mejoras de estabilidad y solubilidad en ausencia de carbohidrato. Las variantes de Fc que comprenden sustituciones en las posiciones 241, 243, 262, y 264, posiciones

que no median la unión a FcγR pero que determinan la interfase entre el carbohidrato y Fc, produce la ablación de la unión a FcγR, presumiblemente debido a que perturban la conformación del carbohidrato. En forma deglicosilada, sin embargo, las variantes de Fc F241E/F243RN/V62E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, y F241 E/F243YN262TN264R muestran una unión más fuerte a FcγRIIIa que en la forma glicosilada, como lo muestra los datos AlphaScreen de la Figura 39. Este resultado indica que estas están en posiciones claves para la optimización de la estructura, estabilidad, solubilidad, y función de la Fc aglicosilada. En conjunto estos resultados sugieren que la modificación de proteínas puede ser usada para restablecer las propiedades funcionales y de solución favorables de los anticuerpos y las fusiones Fc en ausencia de carbohidrato, y pavimentan el camino para anticuerpos y fusiones Fc aglicosilados con propiedades de solución favorables y funcionalidad completa que comprenden sustituciones en estas y otras posiciones de Fc.

Ejemplo 14. Variantes preferidas

Tomados juntos, los datos proporcionados en la presente invención indican que las variantes de Fc que proporcionan propiedades de unión a FcγR optimizada proporcionan además una función efectora mejorada. Las sustituciones en un número de posiciones, que incluyen pero sin limitarse a 236, 239, 246, 246, 249, 255, 258, 260, 264, 267, 268, 272, 274, 281, 283, 304, 324, 326, 327, 330, 332, 333, 334, y 334 proporcionan candidatos prometedores para mejorar la función efectora y por ello las propiedades clínicas de los polipéptidos Fc, que incluyen anticuerpos y fusiones Fc. Debido a que las combinaciones de las variantes de Fc de la presente solicitud han resultado típicamente en mejoras aditivas o sinérgicas de la unión, y en consecuencia mejoras aditivas o sinérgicas en la función efectora, se anticipa que las combinaciones de las variantes de Fc aún sin explorar proporcionadas en la Figura 41 también proporcionarán resultados favorables. Las variantes de Fc preferidas de la presente invención para mejorar la unión al ligando y/o la función efectora de Fc se proporcionan en la Tabla 9.

Tabla 9

G236S	S239D/I332E	S239D/K246H/I332E/	S239D/K246H/T260H/I332E
G236A	S239D/G236A	S239D/V264I/I332E/	S239D/K246H/H268D/I332E
S239D	S239D/G236S	S239D/S267E/I332E/	S239D/K246H/H268E/I332E
S239E	S239D/V264I	S239D/H268D/I332E/	S239D/H268D/S324G/I332E
S239N	S239D/H268D	S239D/H268E/I332E/	S239D/H268E/S324G/I332E
S239Q	S239D/H268E	S239D/S298A/I332E/	S239D/H268D/K326T/I332E
S239T	S239D/S298A	S239D/S324G/I332E/	S239D/H268E/K326T/I332E
K246H	S239D/K326E	S239D/S324I/I332E/	S239D/H268D/A330L/I332E
K246Y	S239D/A330L	S239D/K326T/I332E/	S239D/H268E/A330L/I332E
D249Y	S239D/A330Y	S239D/K326E/I332E/	S239D/H268D/A330Y/I332E
R255Y	S239D/A330I	S239D/K326D/I332E/	S239D/H268E/A330Y/I332E
E258Y	I332E/V264I	S239D/A327D/I332E/	S239D/S298A/S267E/I332E
T260H	I332E/H268D	S239D/A330L/I332E/	S239D/S298A/H268D/I332E
V264I	I332E/H268E	S239D/A330Y/I332E/	S239D/S298A/H268E/I332E
S267E	I332E/S298A	S239D/A330I/I332E/	S239D/S298A/S324G/I332E
H268D	I332E/K326E	S239D/K334T/I332E/	S239D/S298A/S324I/I332E
H268E	I332E/A330L		S239D/S298A/K326T/I332E
E272Y	I332E/A330Y		S239D/S298A/K326E/I332E
E272I	I332E/A330I		S239D/S298A/A327D/I332E
E272H	I332E/G236A		S239D/S298A/A330L/I332E

5	K274E	I332E/G236S		S239D/S298A/A330Y/I332E
	G281D	I332D/V264I		S239D/K326T/A330Y/I332E
	E283L	I332D/H268D		S239D/K326E/A330Y/I332E
	E283H	I332D/H268E		S239D/K326T/A330L/I332E
10	S304T	I332D/S298A		S239D/K326E/A330L/I332E
	S324G	I332D/K326E		
	S324I	I332D/A330L		
	K326T	I332D/A330Y		
15	A327D	I332D/A330I		
	A330Y	I332D/G236A		
	A330L	I332D/G236S		
20	A330I			
	I332D			
	I332E			
25	I332N			
	I332Q			
	E333Y			
30	K334T			
	K334F			

35 Ejemplo 15. Aplicación terapéutica de las variantes de Fc

Un número de variantes de Fc descritas en la presente solicitud tiene potencial significativo para mejorar la eficacia terapéutica de anticuerpos contra el cáncer. Con fines de ilustración, se han incorporado un número de variantes de Fc de la presente solicitud en la secuencia del anticuerpo rituximab. La cadena ligera y la cadena pesada del rituximab de tipo silvestre, descritas en US 5,736,137, se proporcionan en las Figuras 40a y 40b. Las secuencias de anticuerpos anti-CD20 mejoradas se proporcionan en la Figura 40c. Las secuencias de anticuerpos anti-CD20 mejoradas comprenden al menos los aminoácidos no-de tipo silvestre seleccionados del grupo que consiste en X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, y X₉. Estas secuencias de anticuerpos anti-CD20 mejoradas pueden comprender además una sustitución Z₁ y/o Z₂. El uso de rituximab aquí es solamente un ejemplo, y no pretende limitar la aplicación de las variantes de Fc a este anticuerpo o cualquier otro polipéptido Fc particular.

La Tabla 10 representa las posiciones de Fc humano, el residuo silvestre, y las variantes que están incluidas en modalidades particulares de la invención. La Tabla 10 se basa en IgG1, aunque como se apreciará por los expertos en la técnica, se puede hacer lo mismo con cualquier I_g, particularmente IgG2, IgG3 e IgG4.

Tabla 10

Posición	Silvestre (Humano)	Variantes que incluyen la silvestre
118-220	FX	ver figura 3a
Vb(221)	D	D,K,Y
Vb(222)	K	K,E,Y
Vb(223)	T	T,E,K
Vb(224)	H	H,E,Y

ES 2 530 340 T3

	Vb(225)	T	T,E,K,W
	Fx(226)	Tipo silvestre	C
5	Vb(227)	P	P,E,G,K,Y
	Vb(228)	P	P,E,G,K,Y
	Fx(229)	(OPEN)(WT)	C
10	Vb(230)	P	P,A,E,G,Y
	Vb(231)	a	A,E,G,K,P,Y
	Vb(232)	P	P,E,G,K,Y
15	Vb(233)	E	A,D,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(234)	L	L,A,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(235)	L	L,A,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(236)	G	G,A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
20	Vb(237)	G	G,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(238)	P	P,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(239)	S	S,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,O,R,T,V,W,Y
25	Vb(240)	v	V,A,I,M,T
	Vb(241)	F	F,D,E,L,R,S,W,Y
	Fx(242)	Tipo silvestre	L
30	Vb(243)	F	F,E,H,L,Q,R,W,Y
	Vb(244)	P	P,H
	Vb(245)	P	P,A
35	Vb(246)	K	K,D,E,H,Y
	Vb(247)	P	P,G,V
	Vb(248)	Tipo silvestre	K
40	Vb(249)	D	D,H,Q,Y
	Fx(250-254)	Tipo silvestre	-(T-L-M-I-S)-
	Vb(255)	R	R,E,Y
45	Fx(256-257)	Tipo silvestre	-(T-P)-
	Vb(258)	E	E,H,S,Y
	Fx(259)	Tipo silvestre	v
50	Vb(260)	T	T,D,E,H,Y
	Fx(261)	Tipo silvestre	C
	Vb(262)	v	V,A,E,F,I,T
	Vb(263)	v	V,A,I,M,T
55	Vb(264)	v	V,A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
	Vb(265)	D	D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(266)	v	V,A,I,M,T
60	Vb(267)	S	S,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
	Vb(268)	H	H,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y

ES 2 530 340 T3

	Vb(269)	E	E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
	Vb(270)	D	D,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,W,Y
	Vb(271)	a	A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W, Y
	Vb(272)	E	E,D,F,G,H,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
5	Vb(273)	v	V,I
	Vb(274)	K	K,D,E,F,G,H,L,M,N,P,R,T,V,W,Y
	Vb(275)	F	F,L,W
	Vb(276)	N	N,D,E,F,G,H,I,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
10	Fx(277)	Tipo silvestre	W
	Vb(278)	Y	Y,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
	Fx(279)	Tipo silvestre	V
15	Vb(280)	D	D,G,K,L,P,W
	Vb(281)	G	G,D,E,K,N,P,Q,Y
	Vb(282)	V	V,E,G,K,P,Y
20	Vb(283)	E	E,G,H,K,L,P,R,Y
	Vb(284)	V	V,D,E,L,N,Q,T,Y
	Vb(285)	H	H,D,E,K,Q,W,Y
25	Vb(286)	N	N,E,G,P,Y
	Fx(287)	Tipo silvestre	A
	Vb(288)	K	K,D,E,Y
30	Fx(289)	Tipo silvestre	T
	Vb(290)	K	K,D,H,L,N,W
	Vb(291)	P	P,D,E,G,H,I,Q,T
35	Vb(292)	R	R,D,E,T,Y
	Vb(293)	E	E,F,G,H,I,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
	Vb(294)	E	E,F,G,H,I,K,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
40	Vb(295)	Q	Q,D,E,F,G,H,I,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
	Vb(296)	Y	Y,A,D,E,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V
	Vb(297)	N	N,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W, Y
	Vb(298)	S	S,D,E,F,H,I,K,M,N,Q,R,T,W,Y
45	Vb(299)	T	T,A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V, W,Y
	Vb(300)	Y	Y,A,D,E,G,H,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
	Vb(301)	R	R,D,E,H,Y
50	Vb(302)	V	V,I
	Vb(303)	V	V,D,E,Y
	Vb(304)	S	S,D,H,L,N,T
55	Vb(305)	V	V,E,T,Y
	Fx(306-312)	Tipo silvestre	-(L-T-V-L-H-Q-D)-*
	Vb(313)	W	W,F
60	Fx(314-316)	Tipo silvestre	-(L-N-G)-
	Vb(317)	K	K,E,Q

5	Vb(318)	E	E,H,L,Q,R,Y
	Fx(319)	Tipo silvestre	Y
	Vb(320)	K	K,D,F,G,H,I,L,N,P,S,T,V,W,Y
	Fx(321)	Tipo silvestre	C
10	Vb(322)	K	K,D,F,G,H,I,P,S,T,V,W,Y
	Vb(323)	V	V,I
	Vb(324)	S	S,D,F,G,H,I,L,M,P,R,T,V,W,Y
	Vb(325)	N	N,A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
15	Vb(326)	K	K,I,L,P,T
	Vb(327)	a	A,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
	Vb(328)	L	L,A,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
20	Vb(329)	P	P,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(330)	A	A,E,F,G,H,I,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
	Vb(331)	P	P,D,F,H,I,L,M,Q,R,T,V,W,Y
25	Vb(332)	I	I,A,D,E,F,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
	Vb(333)	E	E,F,H,I,L,M,N,P,T,Y
	Vb(334)	K	K,F,I,L,P,T
30	Vb(335)	T	T,D,F,G,H,I,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
	Vb(336)	I	I,E,K,Y
	Vb(337)	S	S,E,H,N

35

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> XENCOR, INC.
- <120> VARIANTES DE FC OPTIMIZADAS
- <130> RXT/FP6797336
- <140> Desconocida, presentada con la presente

- <141> 2005-05-05
- <150> 05747532.9

- <151> 2005-05-05
- <150> PCT/US2005/015935

- <151> 2005-05-05
- <150> US 60/568,440

- <151> 2004-07-15
- <150> US 60/589,906

- <151> 2004-07-20
- <150> US 60/627,026

- <151> 2004-11-09
- <150> US 60/626,991

- <151> 2004-11-10
- <150> US 60/627,774

<151> 2004-11-12
 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <400> 1

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

ES 2 530 340 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 5 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 10 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 15 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 20 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 25 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 30 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 35 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 40 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 45 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 50 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 55 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 60 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

ES 2 530 340 T3

<210> 2
<211> 326

5

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

45

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

50

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

55

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

ES 2 530 340 T3

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 5 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 10 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 15 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 20 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 25 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 30 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 35 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 40 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 45 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 50 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 55 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 60 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 4
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 530 340 T3

<400> 4

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

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

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

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

20 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

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

25 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

30 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

40 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

45 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

50 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

55 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

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

ES 2 530 340 T3

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

5
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

10
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

15
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

20
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

25
<210> 5
<211> 451
<212> PRT
30 <213> Artificial

<220>
<223> Sintético
35 <220>
<221> misc_feature
<222> (243)..(243)
<223> Xaa puede ser Serina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, Asparagina, Glutamina o Treonina

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (244)..(244)
<223> Xaa puede ser Valina, Isoleucina o Metionina

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (268)..(268)
<223> Xaa puede ser Valina, Isoleucina, Treonina o Tirosina

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (272)..(272)
<223> Xaa puede ser Histidina, Ácido Aspártico o Ácido Glutámico

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (276)..(276)
<223> Xaa puede ser Ácido Glutámico o Tirosina

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (278)..(278)

<223> Xaa puede ser Lisina o Ácido Glutámico

<220>

5

<221> misc_feature

<222> (301)..(301)

<223> Xaa puede ser Asparagina o Ácido Aspártico

<220>

10

<221> misc_feature

<222> (302)..(302)

<223> Xaa puede ser Serina, Alanina o Ácido Aspártico

<220>

15

<221> misc_feature

<222> (330)..(330)

<223> Xaa puede ser Lisina, Ácido Glutámico o Treonina

<220>

20

<221> misc_feature

<222> (334)..(334)

<223> Xaa puede ser Alanina, Tirosina, Leucina o Isoleucina

<220>

25

<221> misc_feature

<222> (336)..(336)

<223> Xaa puede ser Isoleucina, Ácido Aspártico, Ácido Glutámico, Asparagina o Glutamina

<400> 5

30

35

40

45

50

55

60

ES 2 530 340 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	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		
Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly	
			100					105					110			
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala	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	

ES 2 530 340 T3

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 5 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 10 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 15 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 20 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Xaa Xaa Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 25 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Xaa Asp Val Ser Xaa
 260 265 270
 30 Glu Asp Pro Xaa Val Xaa 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 Xaa Xaa Thr Tyr
 290 295 300
 35 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 40 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Xaa Ala Leu Pro Xaa Pro Xaa
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 45 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
 50 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
 55 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 60

ES 2 530 340 T3

	420	425	430	
5	His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	435	440	445	
10	Pro Gly Lys			
	450			
	<210> 6			
	<211> 213			
15	<212> PRT			
	<213> Homo sapiens			
	<400> 6			
20	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	
25	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	
30	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu			
	65	70	75	80
35	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr			
	85	90	95	
	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro			
	100	105	110	
40	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	
45	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
	145	150	155	160
50	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	
55	Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			
	195	200	205	
60	Asn Arg Gly Glu Cys			
	210			

ES 2 530 340 T3

<210> 7
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

50

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

55

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

60

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

ES 2 530 340 T3

		195				200						205					
		Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ala	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
		210						215					220				
5		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
10					245						250					255	
		Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
					260					265					270		
15		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
20			290					295					300				
		Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
		305					310					315					320
25		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
30					340					345					350		
		Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
				355					360					365			
35		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
40						390						395					400
		Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
						405					410					415	
45		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			
50		Pro	Gly	Lys													
			450														
55																	
60																	

5	<210> 8 <211> 117 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Sintético
10	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(5) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
15	<220> <221> misc_feature <222> (7)..(8) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
20	<220> <221> misc_feature <222> (10)..(21) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
25	<220> <221> misc_feature <222> (23)..(27) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
30	<220> <221> misc_feature <222> (29)..(29) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
35	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
40	<220> <221> misc_feature <222> (38)..(38) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
45	<220> <221> misc_feature <222> (40)..(40) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
50	<220> <221> misc_feature <222> (42)..(56) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
55	<220> <221> misc_feature <222> (58)..(58) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
60	<220> <221> misc_feature <222> (60)..(66) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 530 340 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (68)..(68)
 5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (70).. (85)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (93)..(93)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (97)..(98)
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(100)
 25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (102)..(117)
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 8

35 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Thr Leu Met
 20 25 30

40 Ile Ser Xaa Thr Pro Xaa Val Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

45 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 50 55 60

50 Xaa Xaa Ala Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Thr Val Leu His Gln Asp Xaa Leu Asn Gly
 85 90 95

55 Xaa Xaa Tyr Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

60 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 115

ES 2 530 340 T3

5	<210> 9 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
10	<400> 9	
		Gly Ser Gly Gly Ser 1 5
15	<210> 10 <211> 5 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
20	<400> 10	
		Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
25	<210> 11 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial	
	<220> <223> Sintético	
30	<400> 11	
		Gly Gly Gly Ser 1
35		
40		

Reivindicaciones

- 5 1. Un polipéptido para usar en un método de tratamiento que comprende poner en contacto células efectoras que expresan FcγRIIb con dicho polipéptido, en donde dicho polipéptido se une con mayor afinidad al receptor FcγRIIb que un polipéptido original y aumenta la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb, y en donde dicho polipéptido comprende una variante Fc de dicho polipéptido Fc original y en donde dicha variante Fc comprende una sustitución de aminoácido S267E en comparación con dicho polipéptido Fc original, en donde dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.
- 10 2. Un polipéptido para usar en un método de tratamiento que comprende poner en contacto células efectoras que expresan FcγRIIb con dicho polipéptido, en donde el polipéptido se une con mayor afinidad al receptor FcγRIIb que un polipéptido original y aumenta la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb, y en donde dicho polipéptido comprende una variante Fc de dicho polipéptido Fc original y en donde dicha variante Fc comprende una sustitución de aminoácido S267D en comparación con dicho polipéptido Fc original, en donde dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.
- 15 3. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor FcγRIIb que más de 5-veces mayor que la del polipéptido Fc original.
- 20 4. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicha variante de Fc tiene una afinidad por el receptor FcγRIIb que está entre 5-veces y 300-veces mayor que la del polipéptido Fc original.
- 25 5. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho polipéptido es un anticuerpo.
- 30 6. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo quimérico.
- 35 7. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
- 40 8. El polipéptido para usar de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.
- 45 9. El polipéptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde dicho anticuerpo comprende además una glicofoma modificada.
- 50 10. El polipéptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el aumento de la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb se usa para tratar enfermedades autoinmunes.
- 55 11. El polipéptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el aumento de la actividad inhibidora del receptor FcγRIIb se usa para tratar una enfermedad inflamatoria.
- 60 12. Un método para aumentar la unión de un polipéptido Fc al receptor FcγRIIb, dicho método comprende sustituir en un polipéptido Fc original el aminoácido Ser en la posición 267 con el aminoácido Glu para proporcionar una variante Fc del polipéptido Fc original, en donde dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.
13. Un método para aumentar la unión de un polipéptido Fc al receptor FcγRIIb, dicho método comprende sustituir en un polipéptido Fc original el aminoácido Ser en la posición 267 con el aminoácido Asp para proporcionar una variante Fc del polipéptido Fc original, en donde dicha numeración está de acuerdo con el índice de UE.
14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el polipéptido es un anticuerpo.
15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo quimérico, y/o en donde dicho anticuerpo comprende además una glicofoma modificada.
16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en donde la sustitución de aminoácido se realiza mediante la generación de un ácido nucleico que codifica dicha variante.

Figura 1

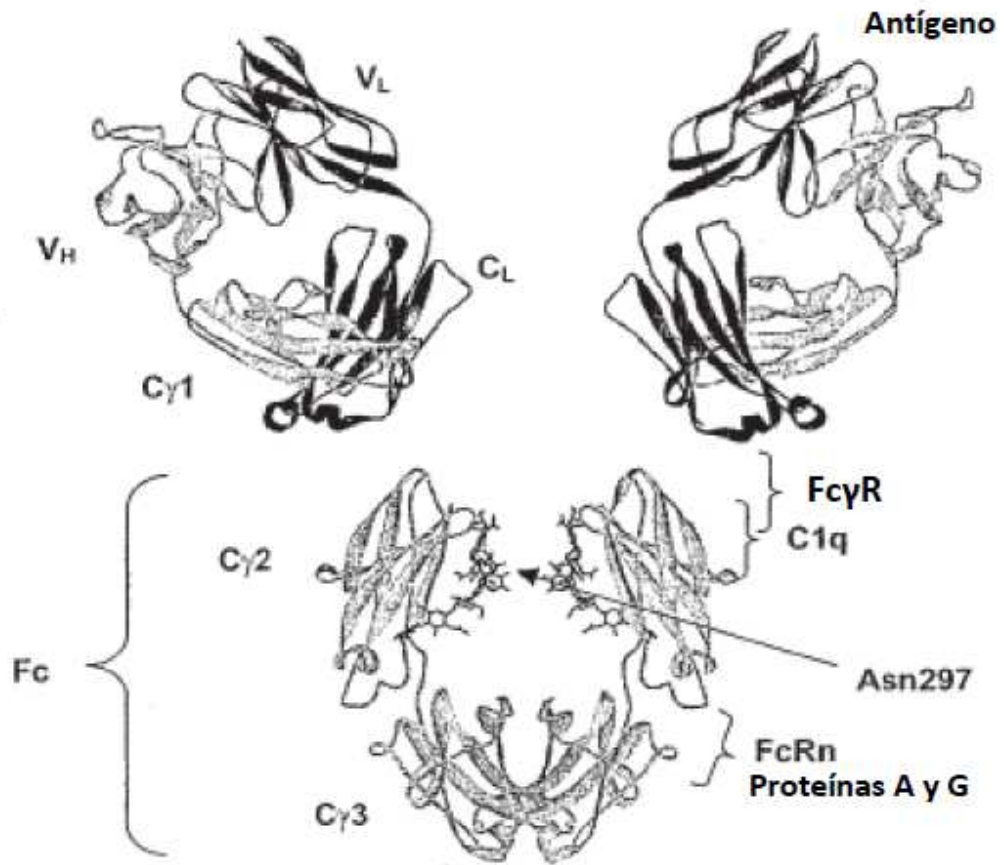


Figura 2

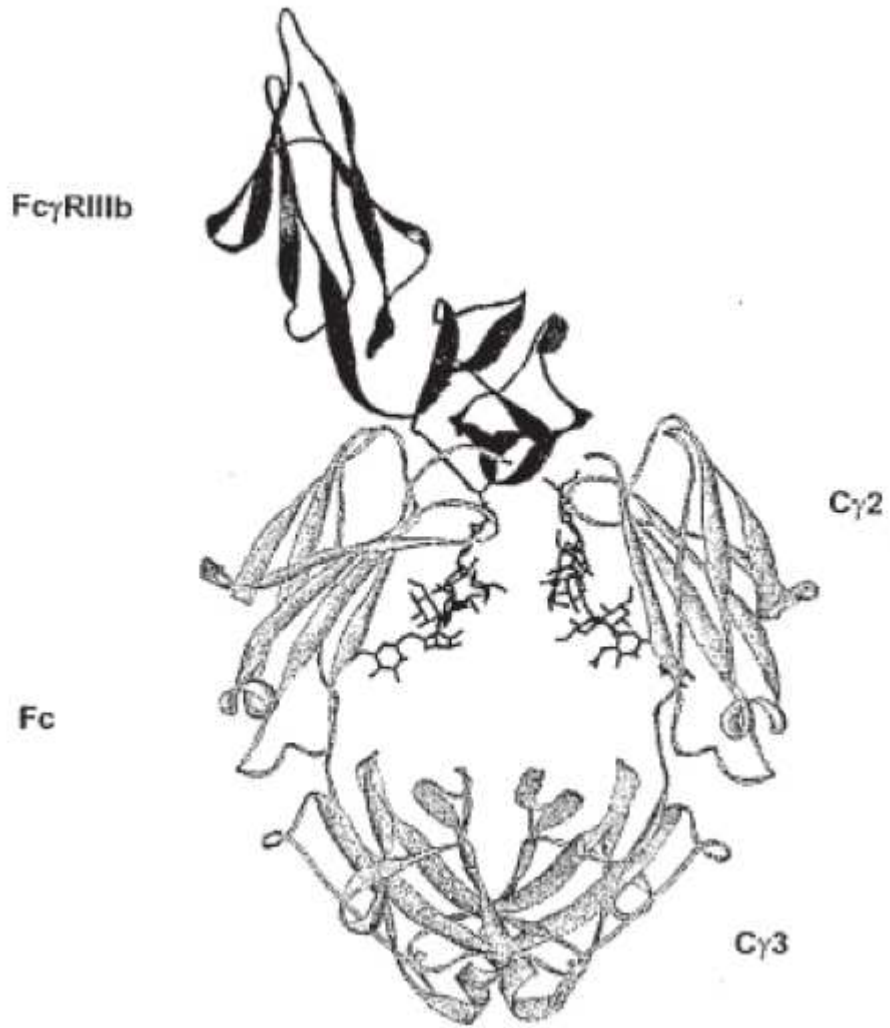


Figura 3a

		CH1																				
Índice EU		118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138
IgG1	A S T K O P S V F P L A P S S K S T S G G																					
IgG2	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S																					
IgG3	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G O																					
IgG4	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S																					
Índice EU		139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159
IgG1	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N																					
IgG2	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N																					
IgG3	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N																					
IgG4	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N																					
Índice EU		160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
IgG1	S O A L T S G V H T F P A V L Q S S O L Y																					
IgG2	S O A L T S G V H T F P A V L Q S S O L Y																					
IgG3	S O A L T S G V H T F P A V L Q S S O L Y																					
IgG4	S O A L T S G V H T F P A V L Q S S O L Y																					
Índice EU		181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201
IgG1	S L S S V V T V P S S S L O T Q T Y I C N																					
IgG2	S L S S V V T V P S S S L O T Q T Y I C N																					
IgG3	S L S S V V T V P S S S L O T Q T Y I C N																					
IgG4	S L S S V V T V P S S S L O T Q T Y I C N																					
Índice EU		202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220		
IgG1	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C																					
IgG2	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C																					
IgG3	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C																					
IgG4	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C																					
Hinge		Fc >																				
Índice EU		221	222	223	224	225	226	227	228													
IgG1	D K T H T C P P																					
IgG2	D K T H T C P P																					
IgG3	D K T H T C P P																					
IgG4	D K T H T C P P																					
Índice EU		Fc >																				
Índice EU		229	230	231	232	233	234	235	236													
IgG1	C P A P E L L O																					
IgG2	C P A P E L L O																					
IgG3	C P A P E L L O																					
IgG4	C P A P E L L O																					

Figura 3b

C12	
Índice EU	237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257
IgG1	O P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG2	O P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG3	O P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
IgG4	O P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
Índice EU	258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278
IgG1	E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
IgG2	E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
IgG3	E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
IgG4	E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
Índice EU	279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299
IgG1	V D G V E V H N A K T K P R E E G Y N S T
IgG2	V D G V E V H N A K T K P R E E G Y N S T
IgG3	V D G V E V H N A K T K P R E E G Y N S T
IgG4	V D G V E V H N A K T K P R E E G Y N S T
Índice EU	300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320
IgG1	Y R V V S V L T V L H Q D W L N O K E Y K
IgG2	Y R V V S V L T V L H Q D W L N O K E Y K
IgG3	Y R V V S V L T V L H Q D W L N O K E Y K
IgG4	Y R V V S V L T V L H Q D W L N O K E Y K
Índice EU	321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340
IgG1	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG2	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG3	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
IgG4	C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K
C13	
Índice EU	341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361
IgG1	O G P R E P G V Y T L P P S R D E L T K N
IgG2	O G P R E P G V Y T L P P S R D E L T K N
IgG3	O G P R E P G V Y T L P P S R D E L T K N
IgG4	O G P R E P G V Y T L P P S R D E L T K N
Índice EU	362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382
IgG1	O V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG2	O V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG3	O V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
IgG4	O V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E
Índice EU	383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403
IgG1	S N O G P E N N Y K T T P P V L D S D O S
IgG2	S N O G P E N N Y K T T P P V L D S D O S
IgG3	S N O G P E N N Y K T T P P V L D S D O S
IgG4	S N O G P E N N Y K T T P P V L D S D O S
Índice EU	404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424
IgG1	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q O N V F S
IgG2	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q O N V F S
IgG3	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q O N V F S
IgG4	F F L Y S K L T V D K S R W Q Q O N V F S
Índice EU	425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445
IgG1	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG2	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG3	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
IgG4	C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
Índice EU	446 447
IgG1	O K
IgG2	O K
IgG3	O K
IgG4	O K

Figura 4

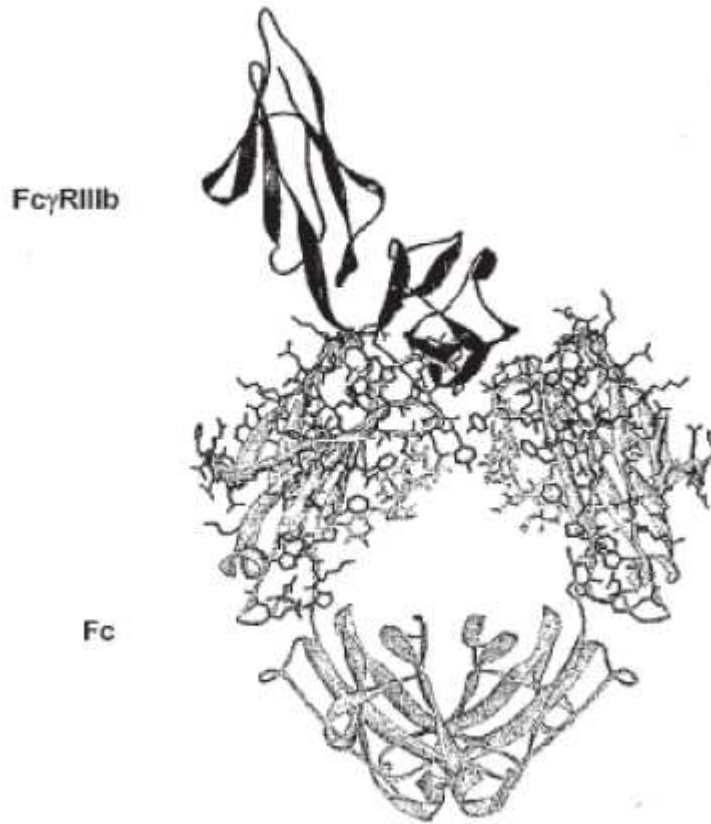


Figura 5



Figura 6

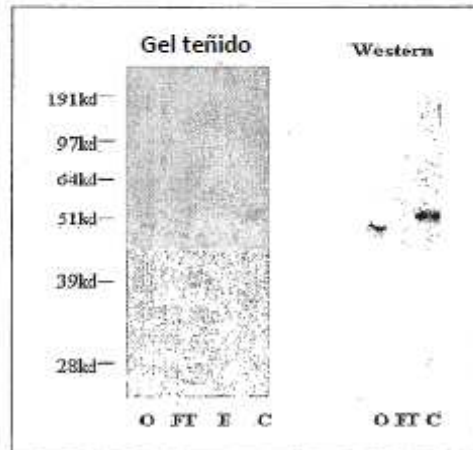


Figura 7

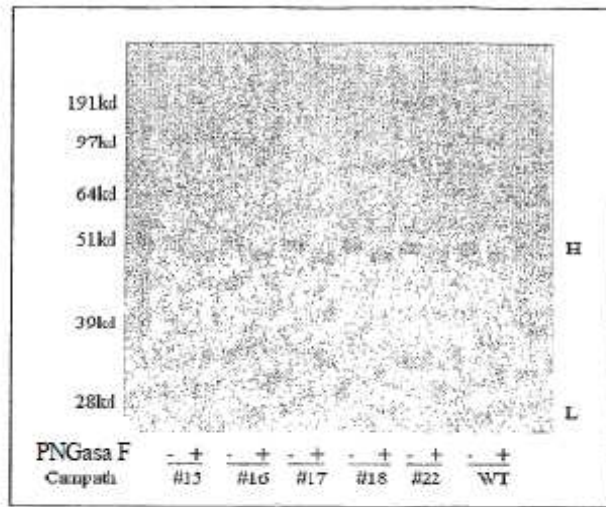


Figura 8

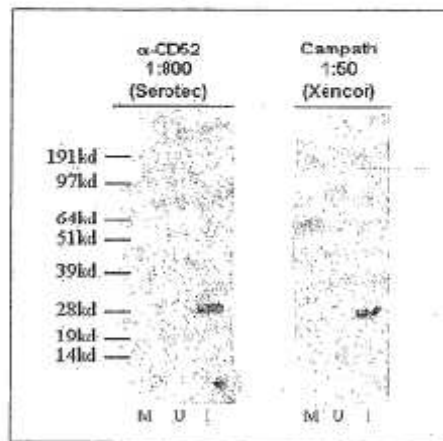


Figura 9

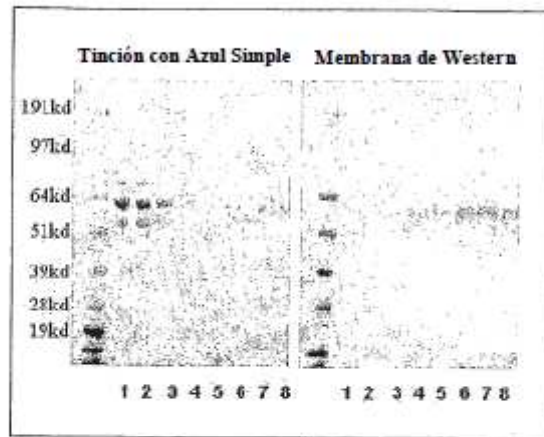


Figura 10

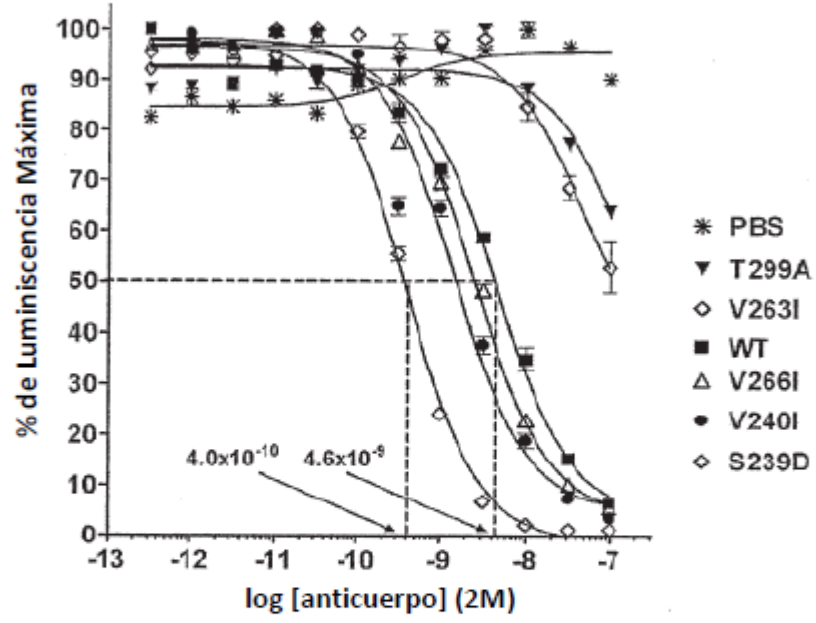


Figura 11a

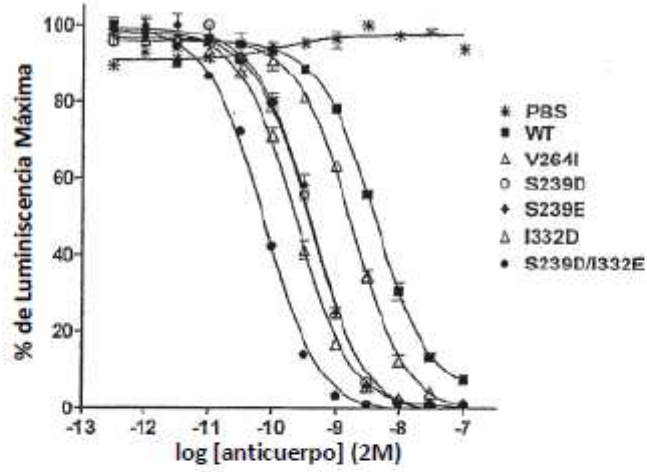


Figura 11b

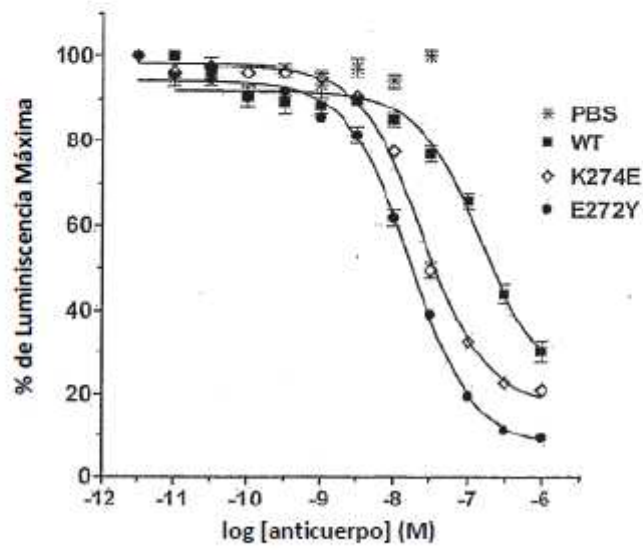


Figura 12

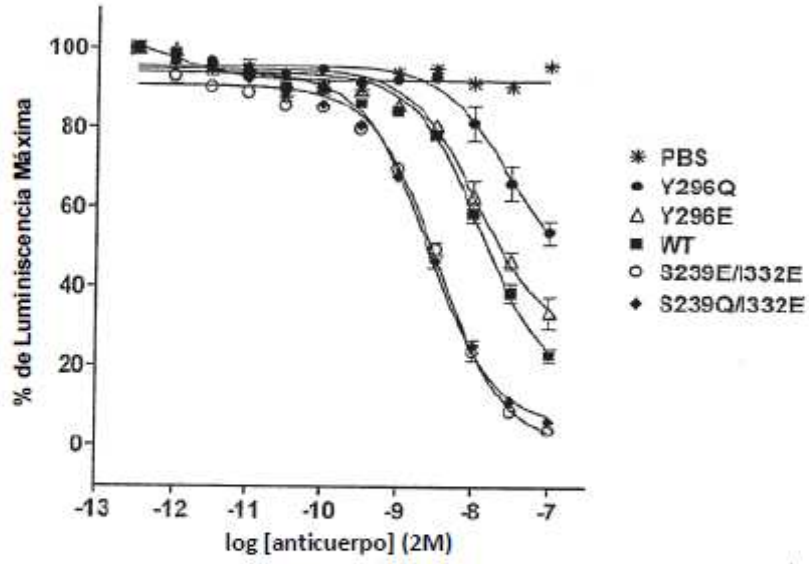


Figura 13

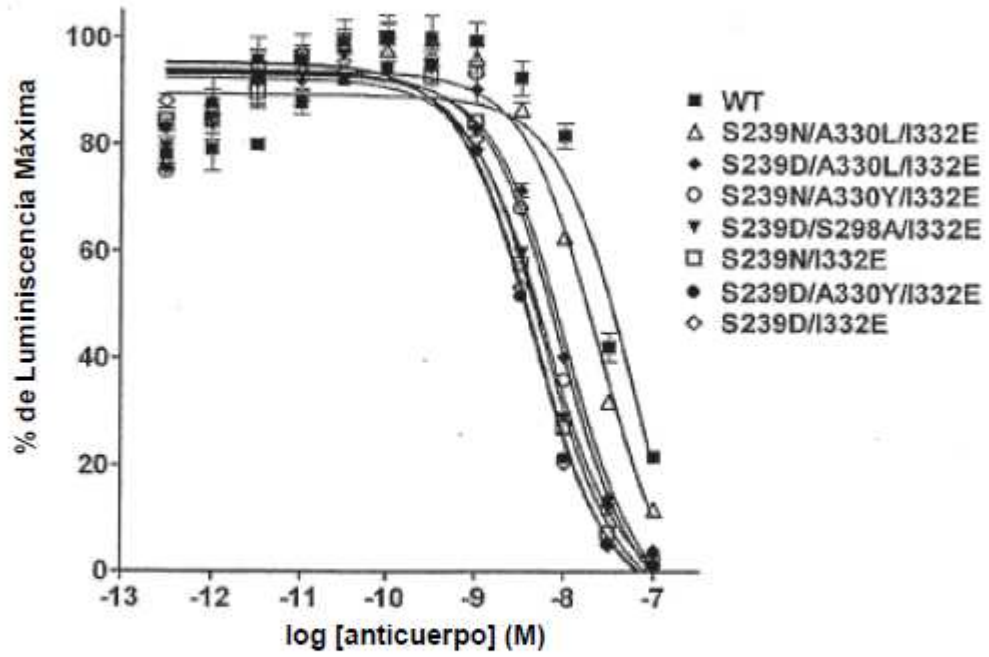


Figura 14

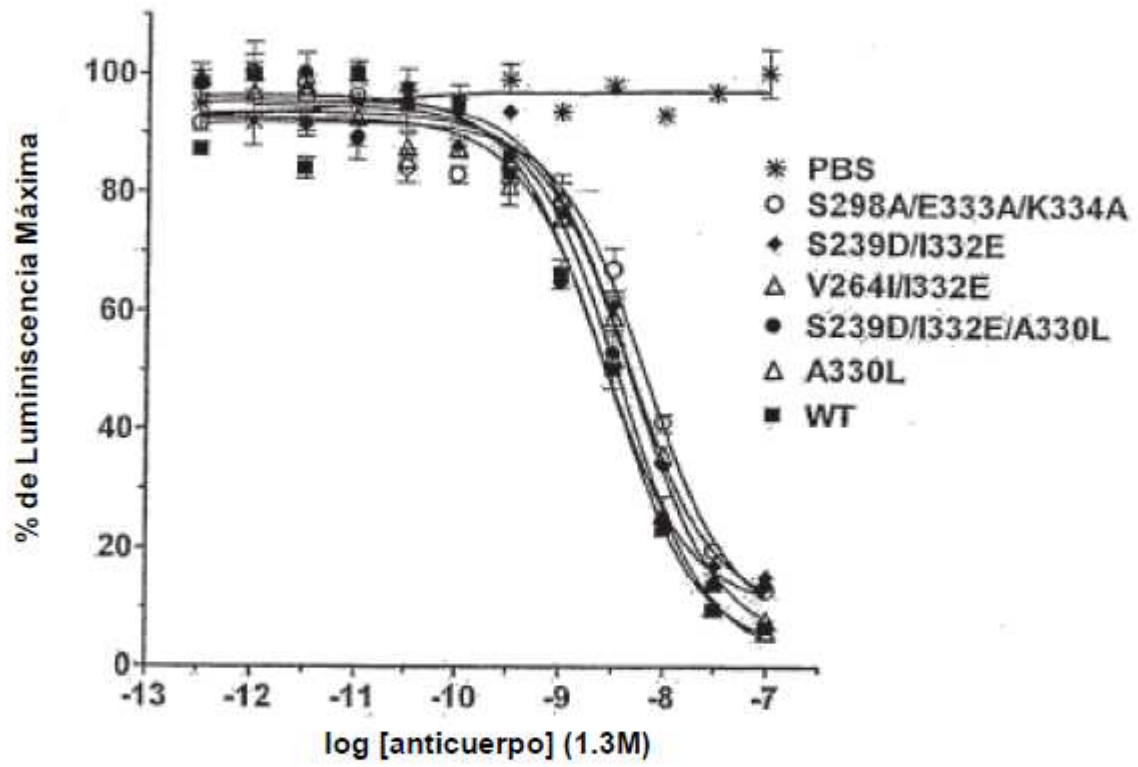


Figura 15

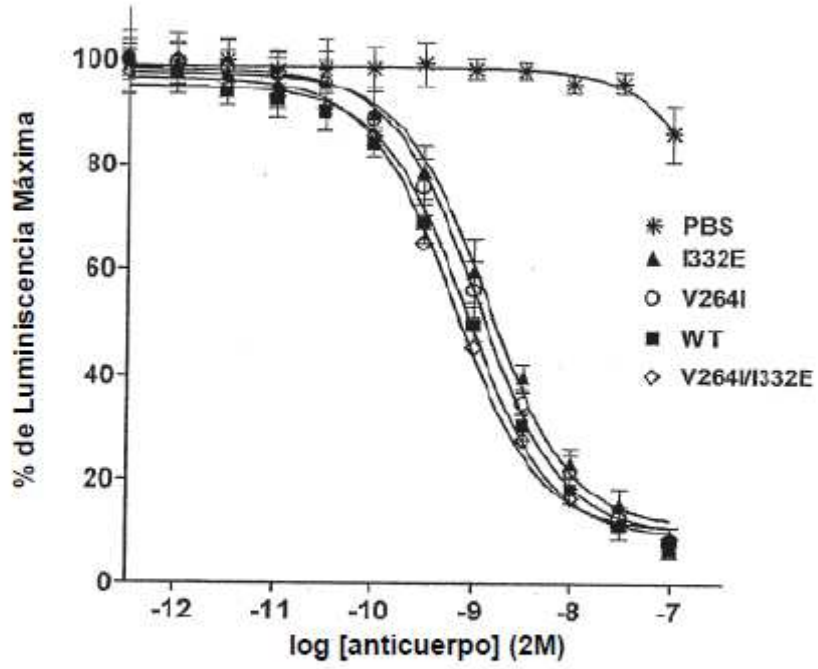


Figura 16a

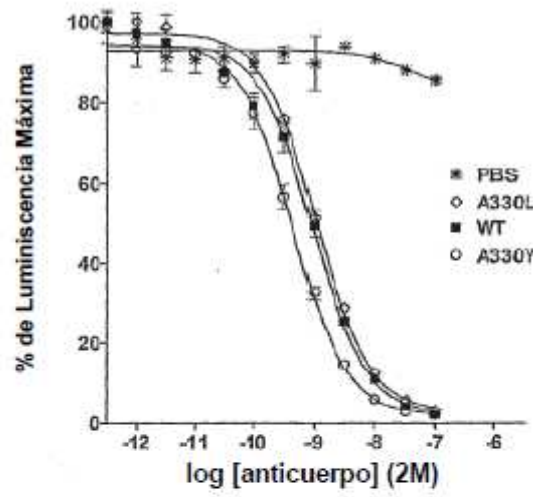


Figura 16b

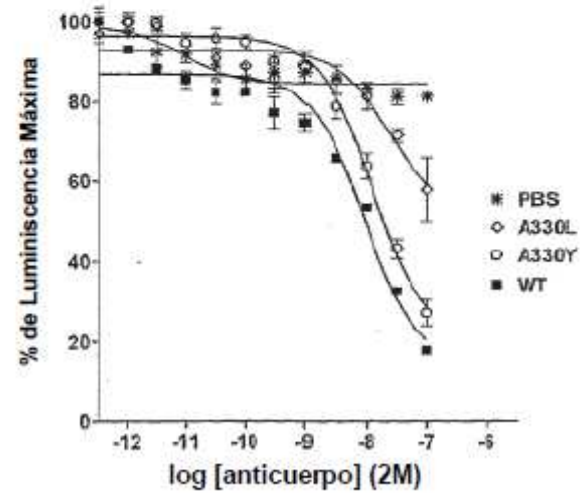


Figura 17a

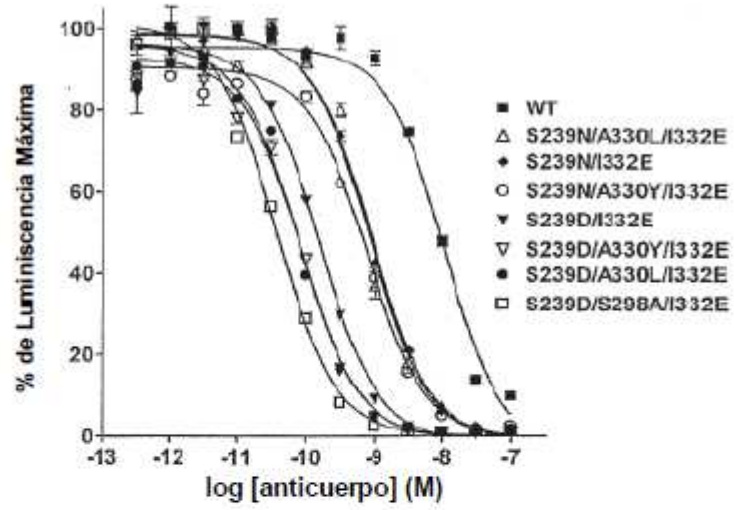


Figura 17b

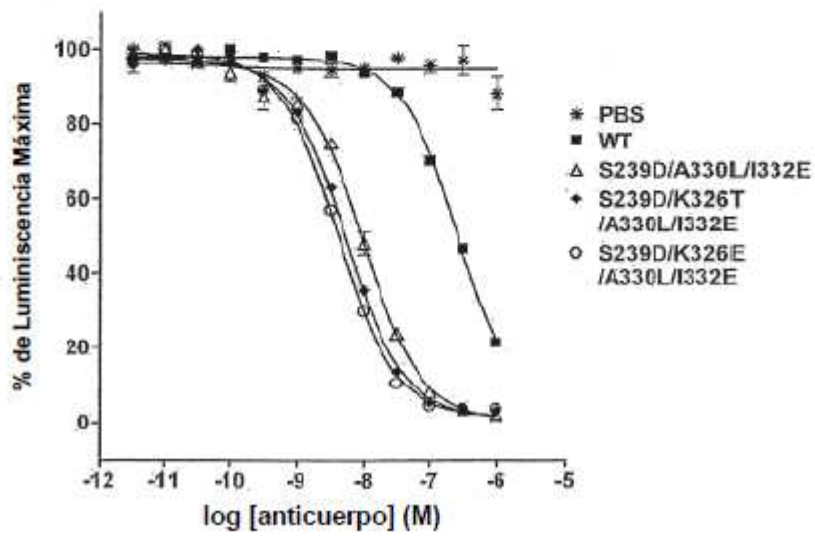


Figura 17c

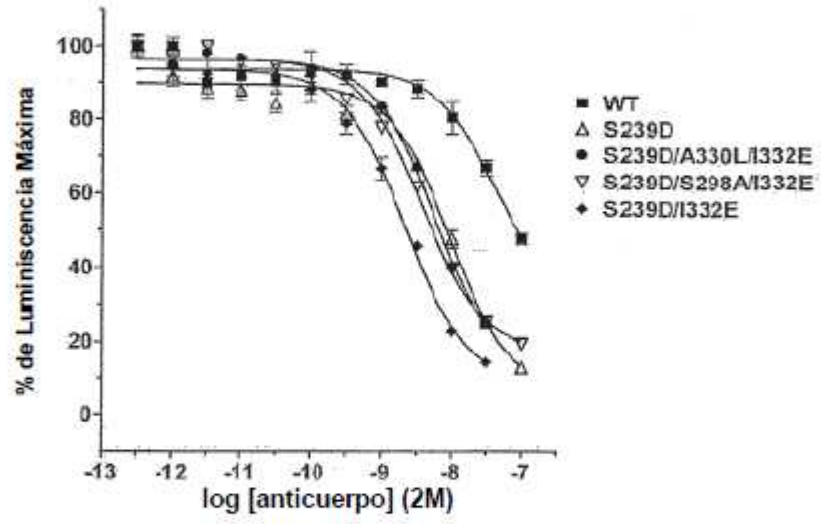


Figura 18

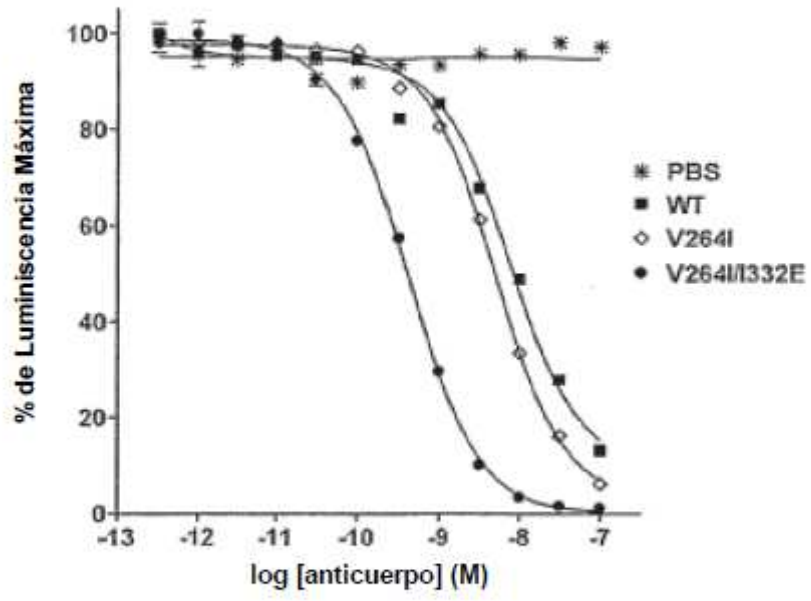


Figura 19

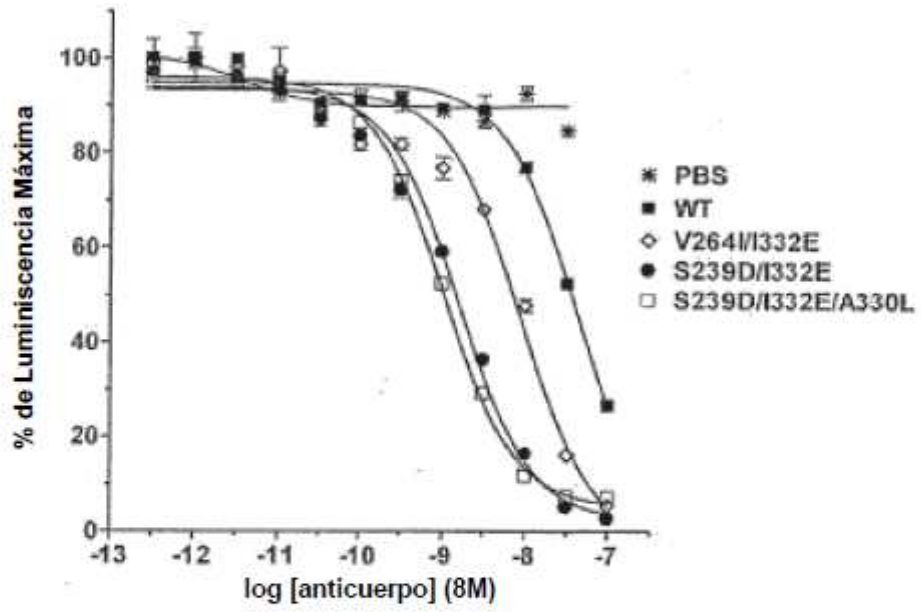


Figura 20a

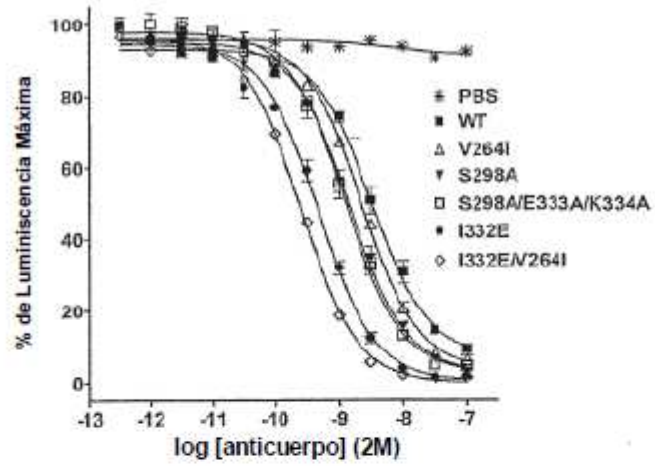


Figura 20b

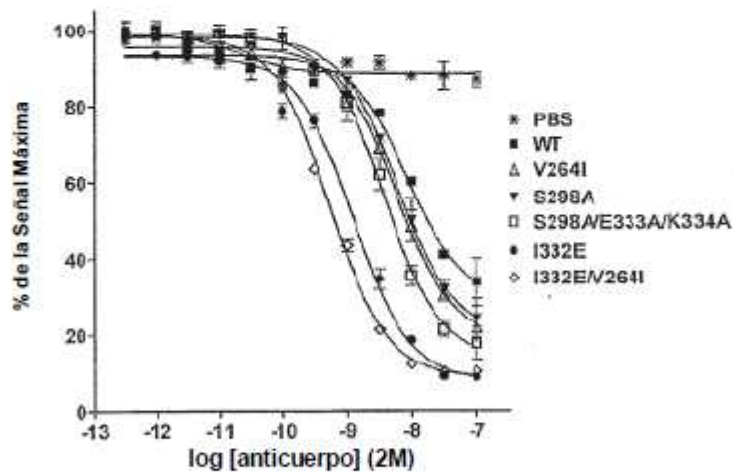


Figura 21a

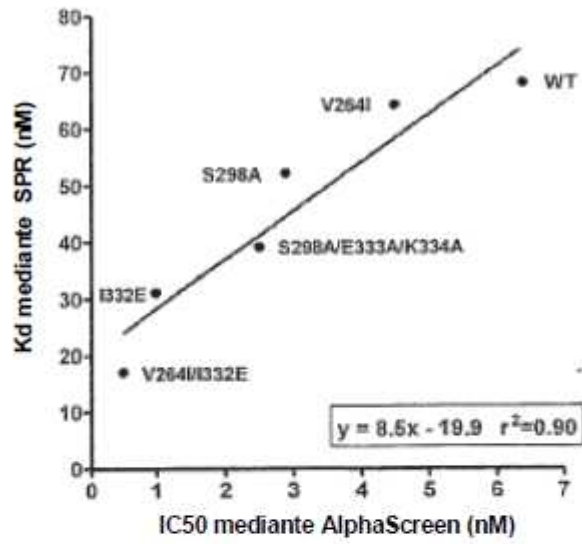


Figura 21b

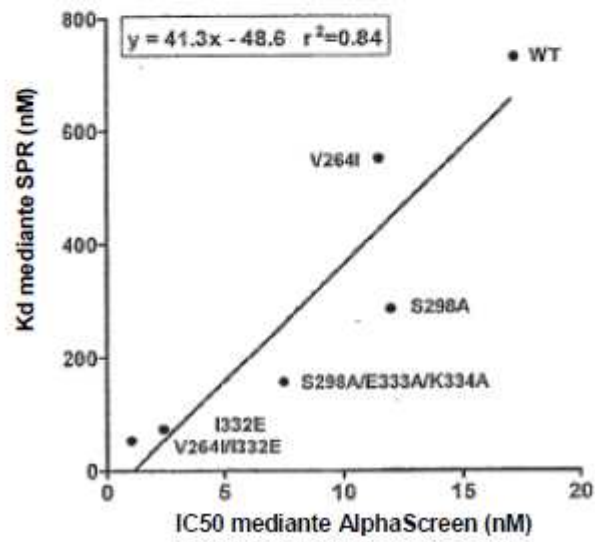


Figura 21c

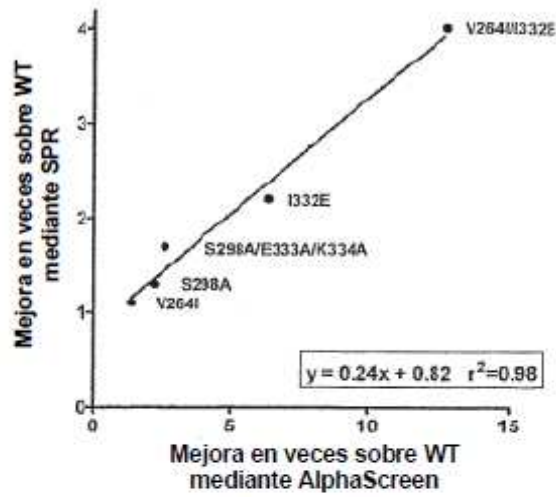


Figura 21d

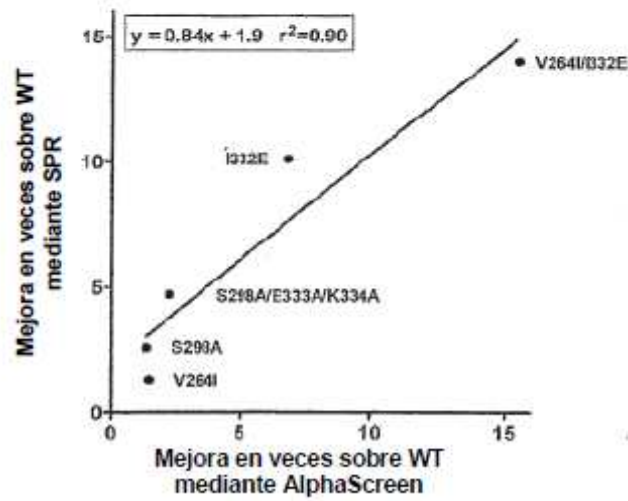


Figura 22a

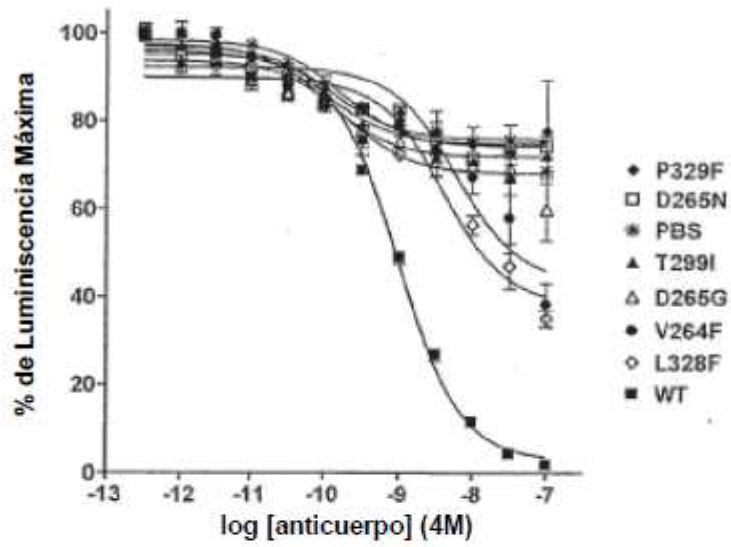


Figura 22b

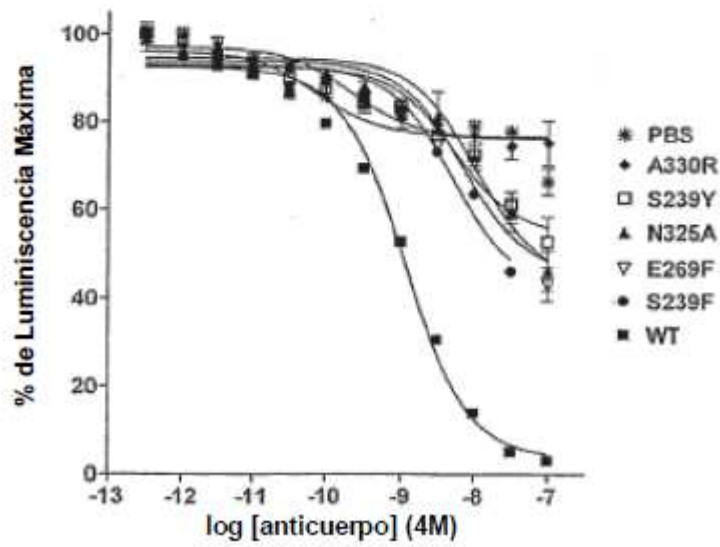


Figura 23a

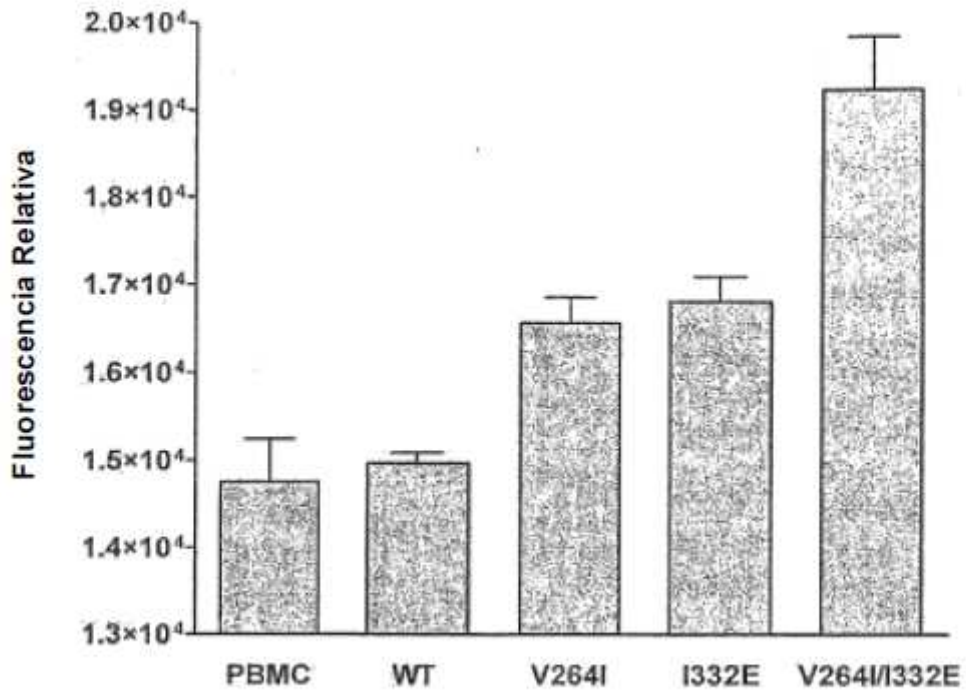


Figura 23b

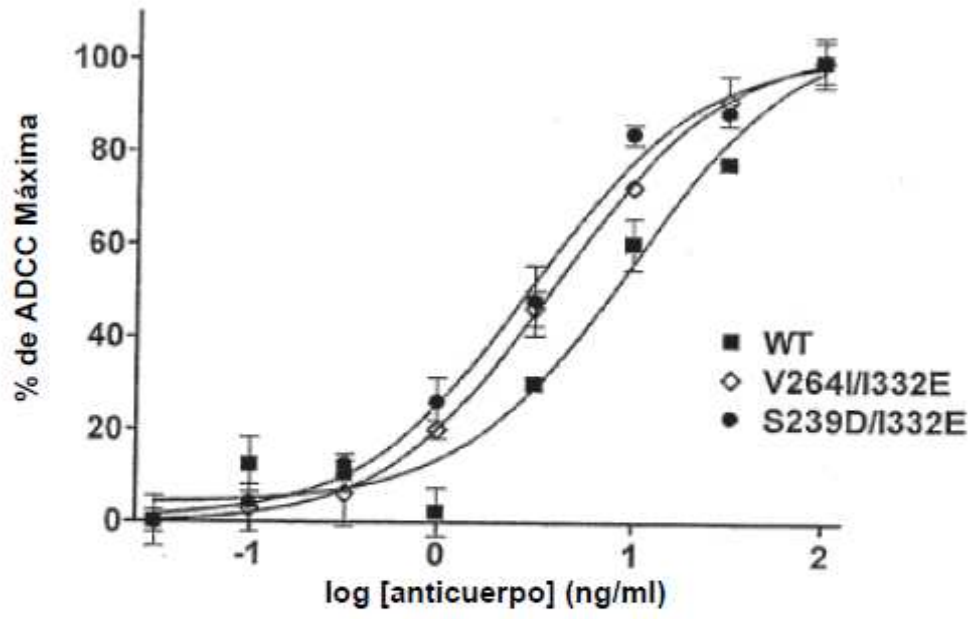


Figura 24a

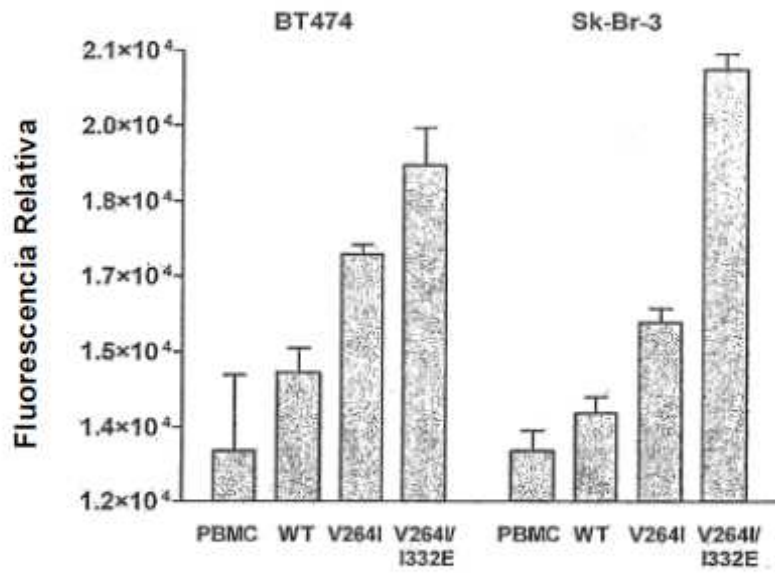


Figura 24b

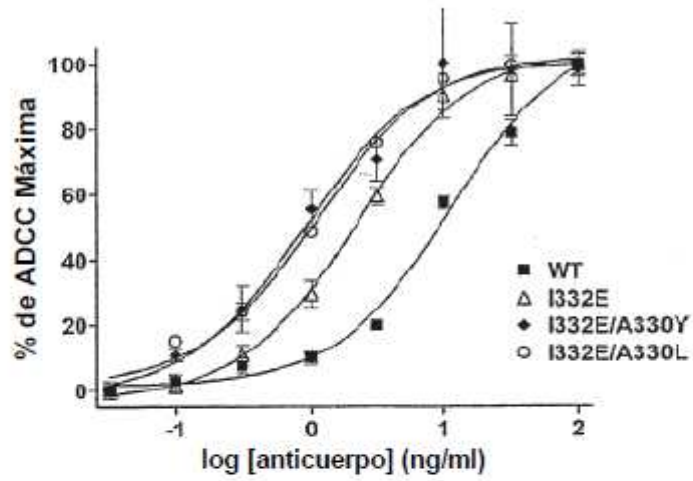


Figura 24c

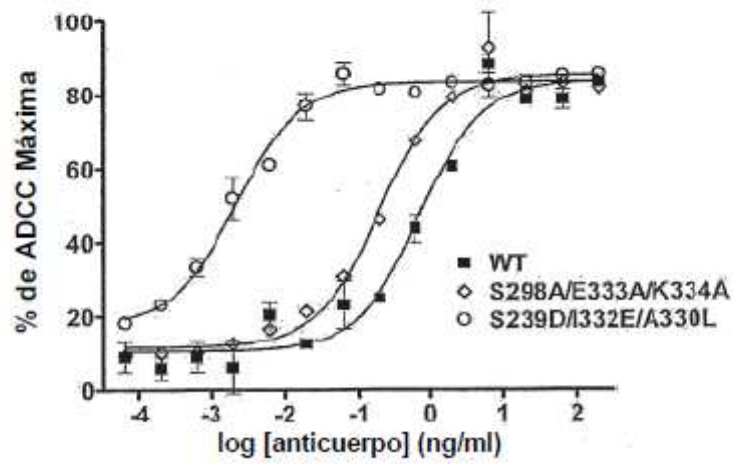


Figura 25a

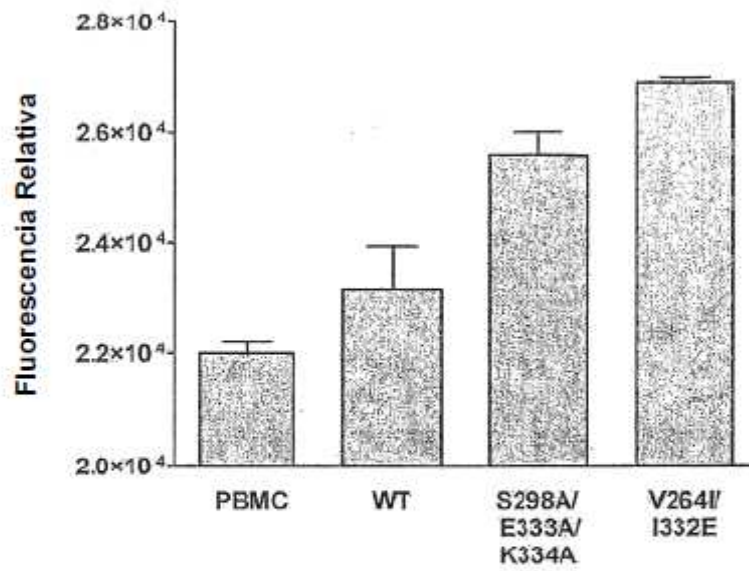


Figura 25b

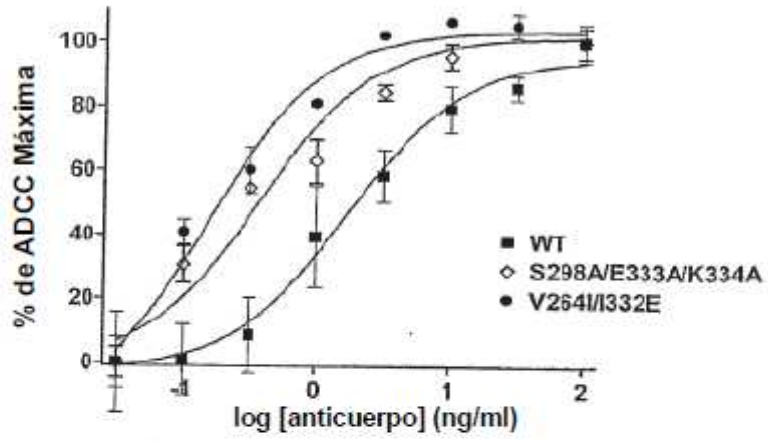


Figura 25c

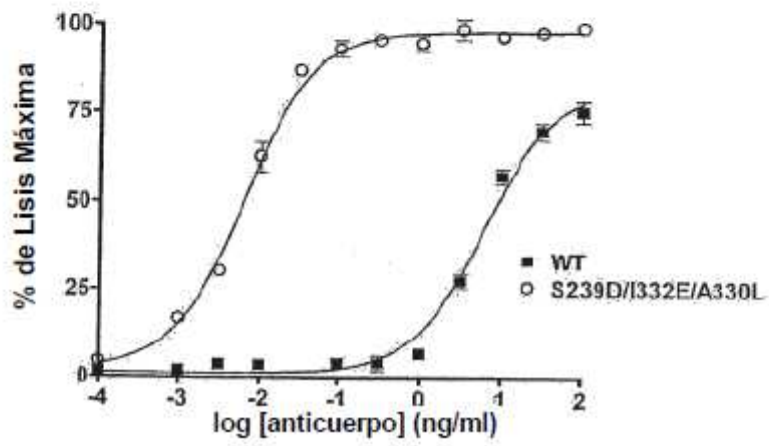


Figura 26a

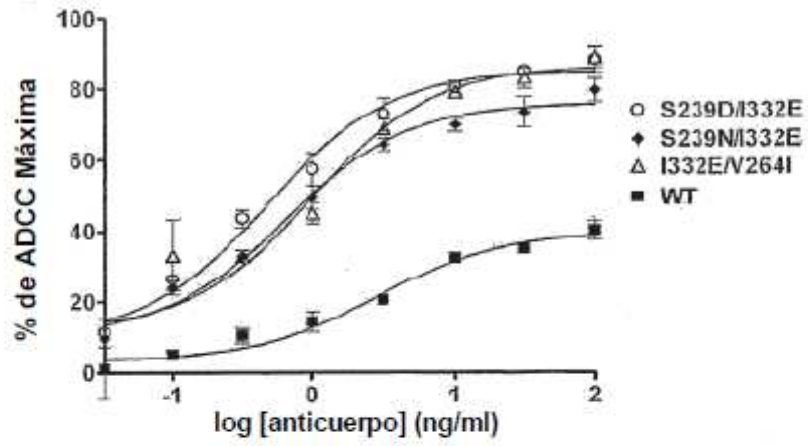


Figura 26b

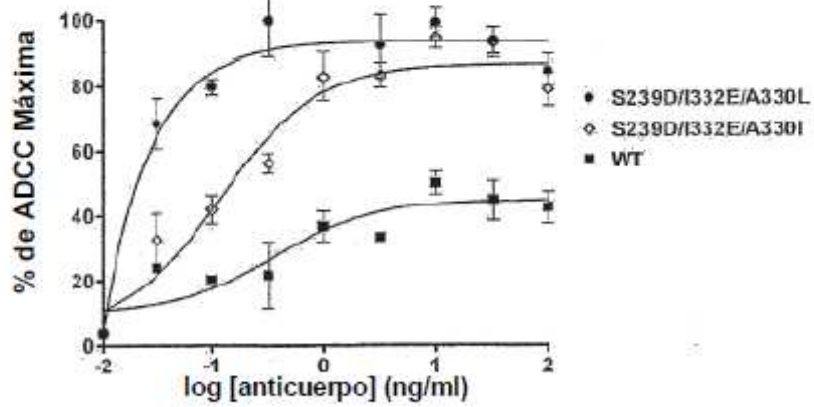


Figura 27

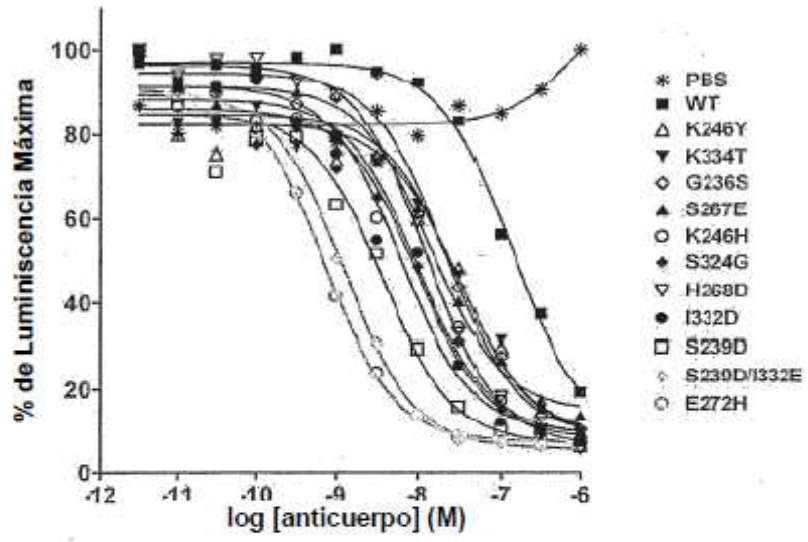


Figura 28

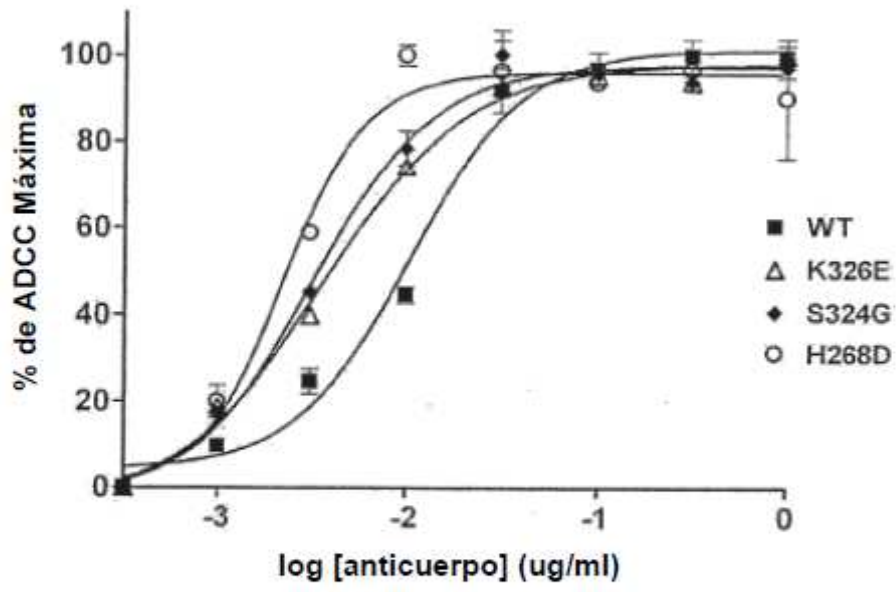


Figura 29a

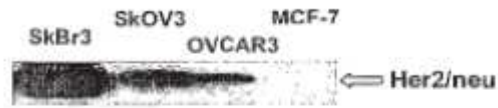


Figura 29b

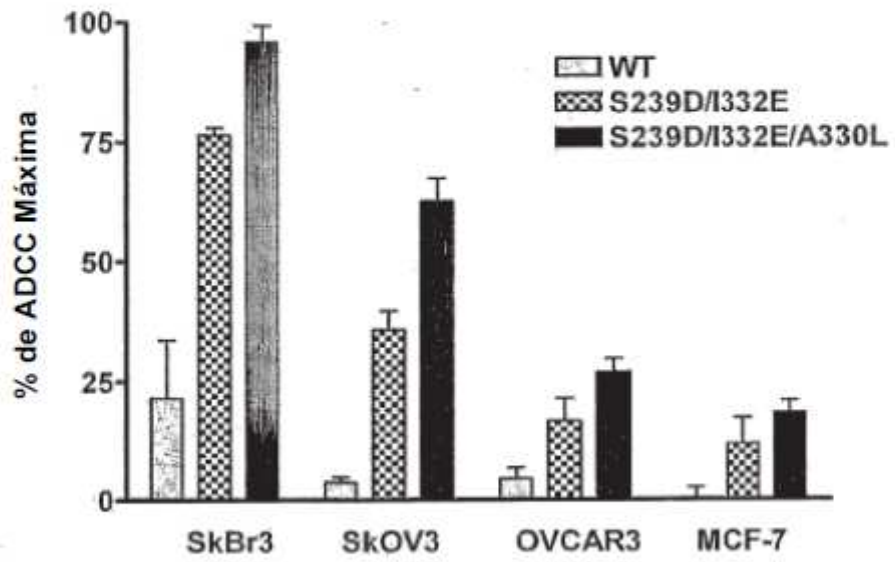


Figura 30

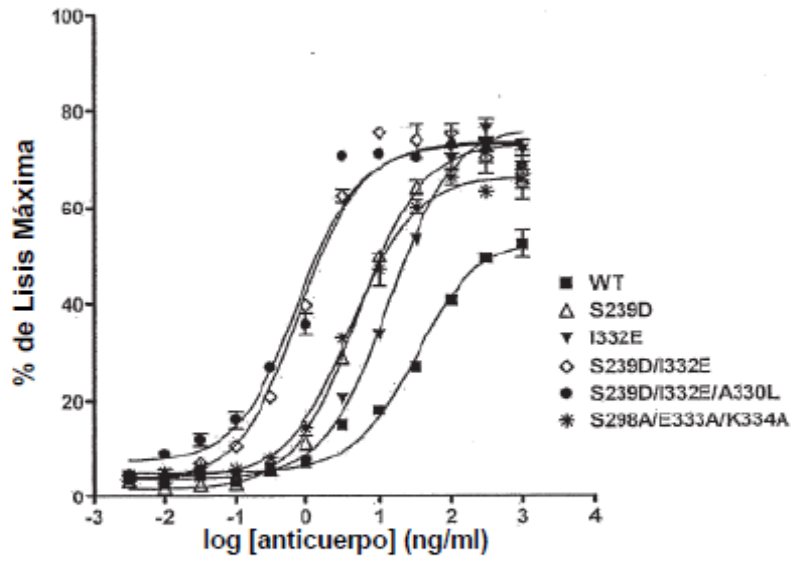


Figura 31

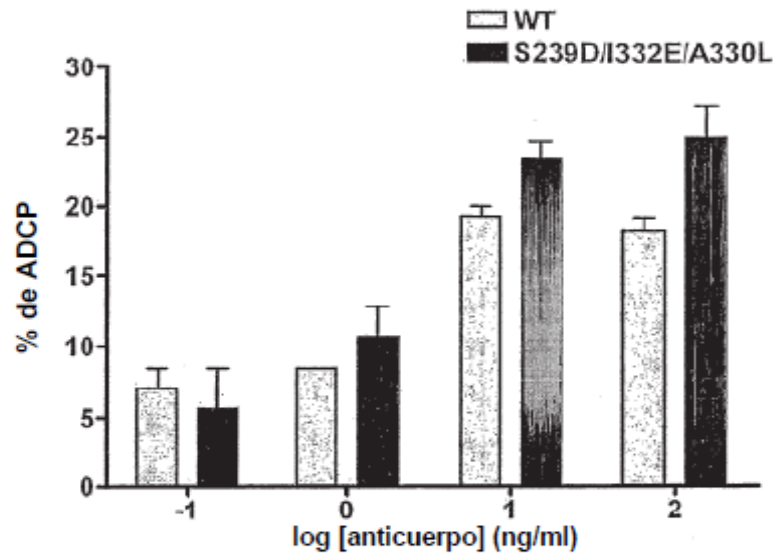


Figura 32a

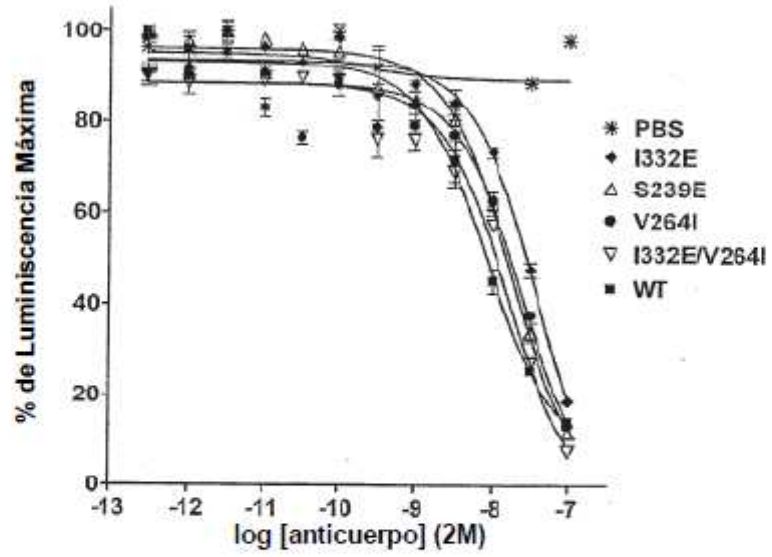


Figura 32b

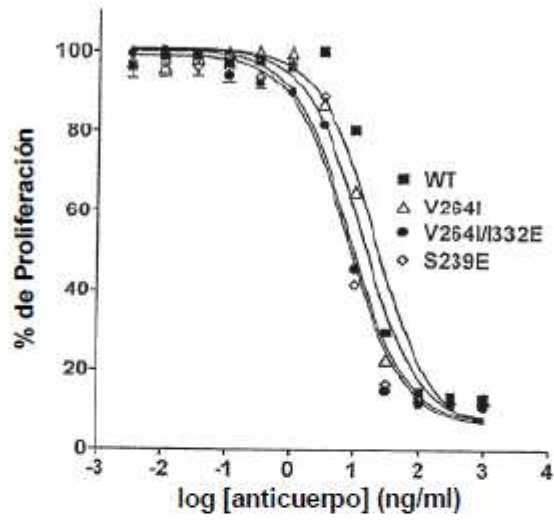


Figura 32c

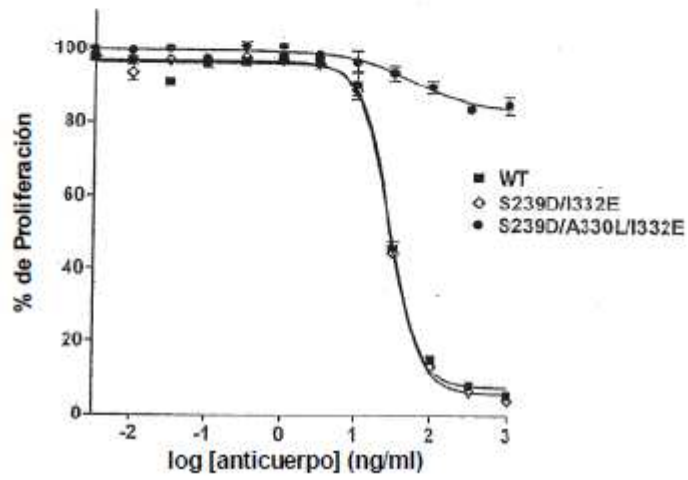


Figura 33a

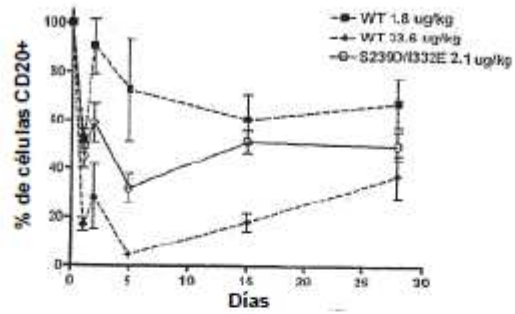


Figura 33b

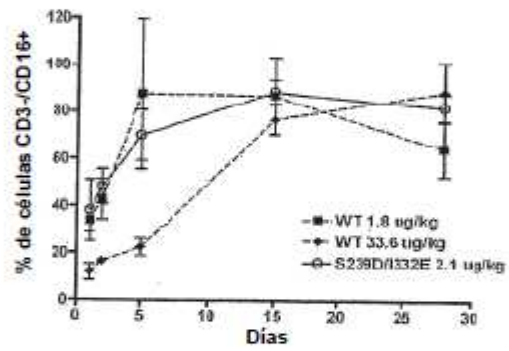


Figura 33c

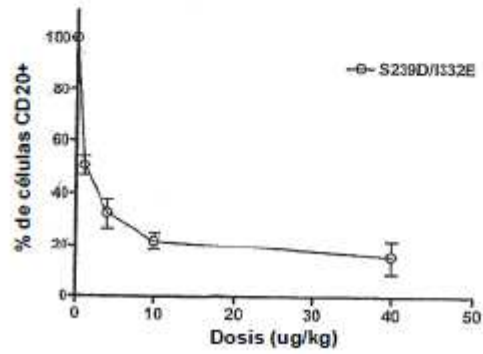


Figura 34a

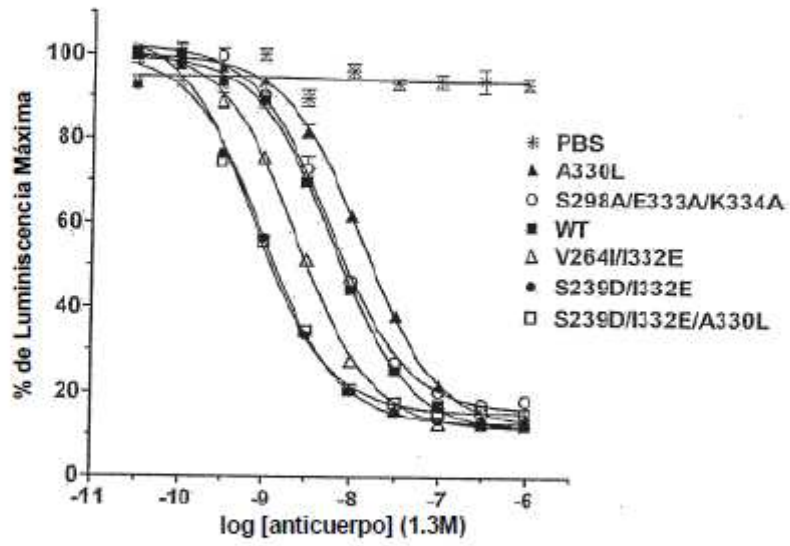


Figura 34b

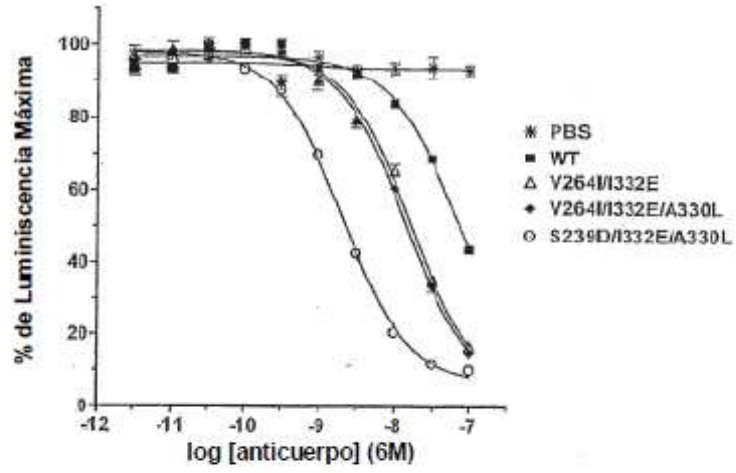


Figura 35c

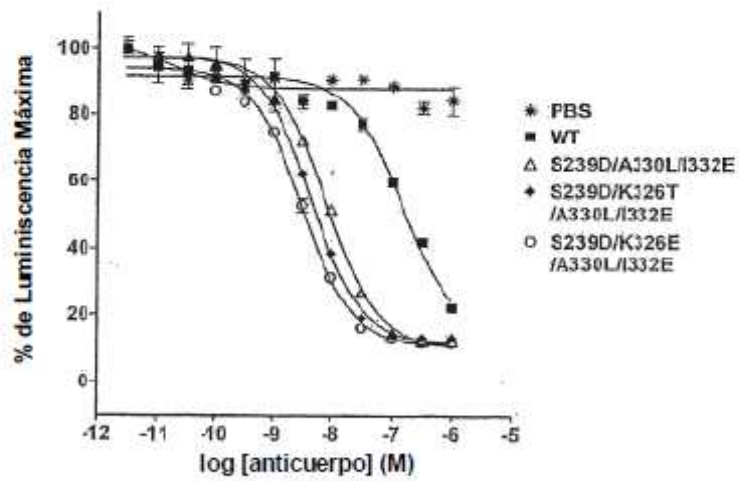


Figura 35

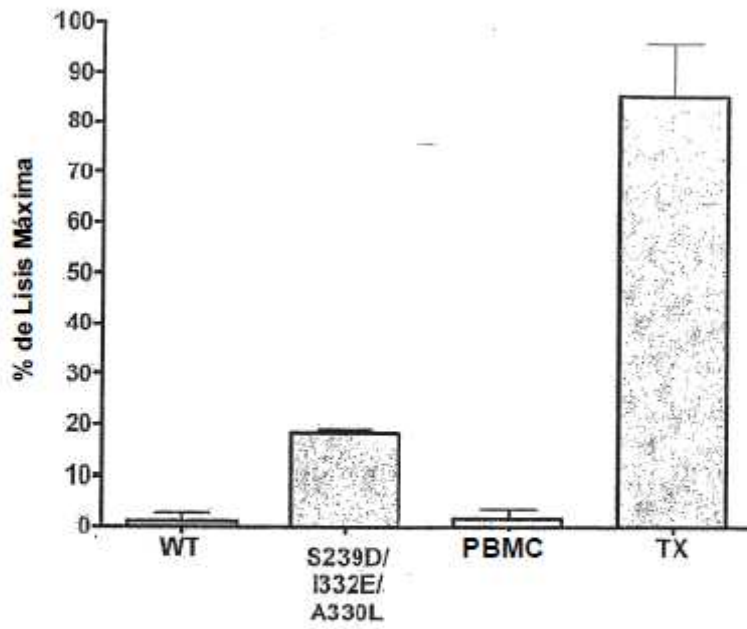


Figura 36

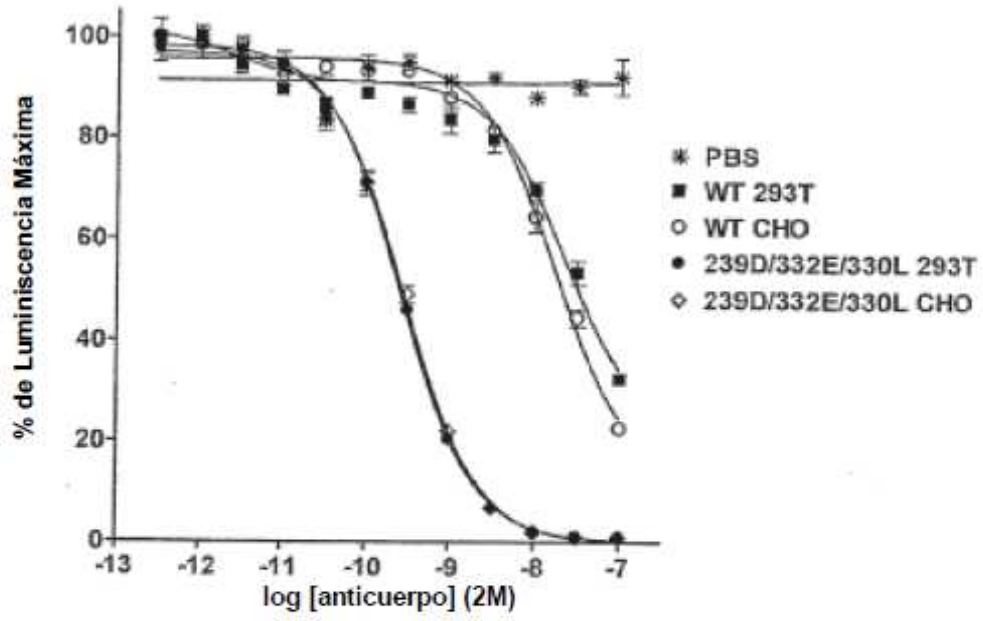


Figura 37a

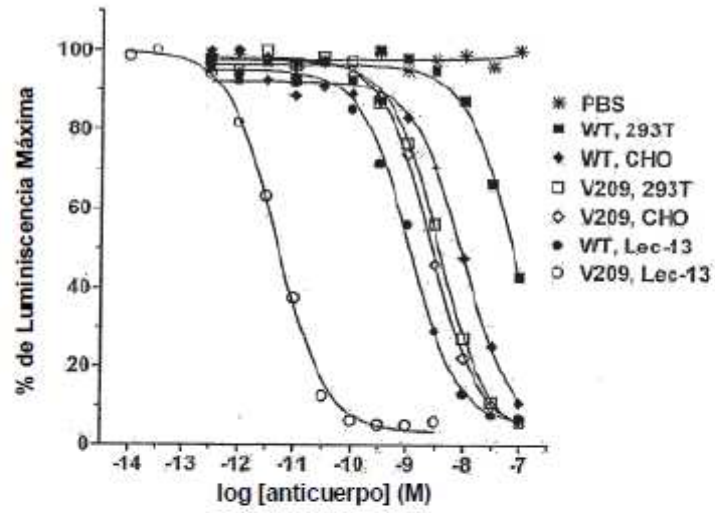


Figura 37b

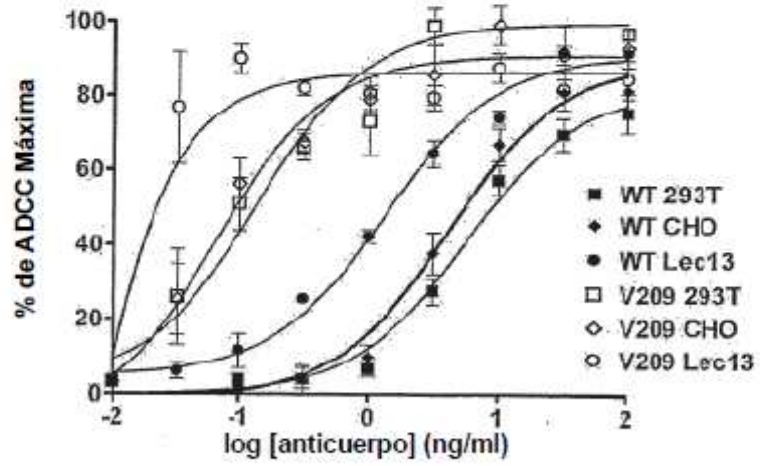


Figura 38

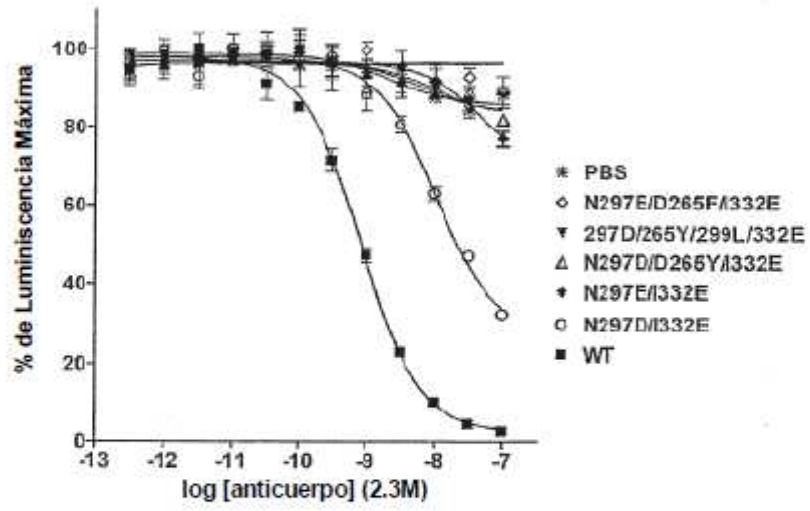


Figura 39

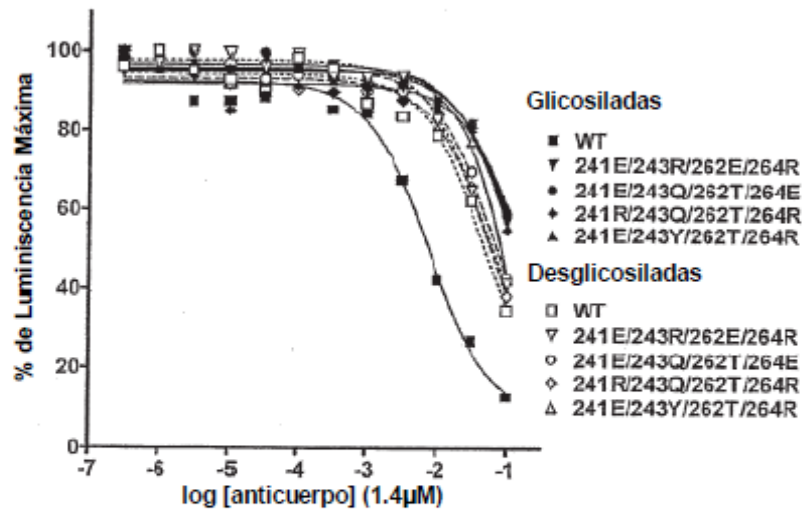


Figura 40a

Cadena pesada de anti-CD20 que comprende posibles variantes de Fc

QVQLQQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNOQKFK
GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGQDWYFNWVWAGATTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTCPPCPAPELGGPX,X₁FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VW₂DV₃SV₄EDPX₅VX₆FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX₇Z₁TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNZ₂ALPX₃PX₄EKTISKAKGQPREPOVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Posición	WT	Sustituciones posibles
X ₁	S	D, E, N, Q, T
X ₂	V	I, M
X ₃	V	I, T, Y
X ₄	H	D, E
X ₅	E	Y
X ₆	K	E
X ₇	N	D
X ₈	A	Y, L, I
X ₉	I	D, E, N, Q
Z ₁	S	A, D
Z ₂	K	E, T

Figura 40b

Cadena ligera de anti-CD20

CIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASSSVSYHWFQQKPGSSPKPWIIYATSNLASGVPVRFSGSGSG
TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

Figura 40c

Cadena pesada de anti-CD20

QVQLQQPGAEELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNOQKFK
GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGQDWYFNWVWAGATTVTVSAASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG
TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
WVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNOVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

ES 2 530 340 T3

Figura 41

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:I Ib	
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf		
1	V264A	a	0.67	0.06	0.32	0.69	1.03	0.40	0.91	0.57	0.14	0.25	2.16	0.23	1.12	0.18	0.13	
2	V264L	a	0.76	0.07	0.43	0.67	1.17	0.33	0.90	0.56	0.53	0.31	1.44	0.21	0.81	0.17	0.19	
3	V264I	atr	1.35	0.05	0.70	0.57	1.28	0.33	1.05	0.51	0.22	0.22	8.58	0.56	1.32	0.18	0.66	
4	F241W	a	1.59	0.13	0.68	0.62	1.10	0.34	0.85	0.57	1.43	0.22	3.68	0.21	1.70	0.25	0.29	
5	F241L	a	0.84	0.25	0.77	0.57	1.20	0.34	1.12	0.50	0.32	0.23	3.24	0.30	1.99	0.48	0.20	
6	F243W	a	1.61	0.23	1.71	0.58	1.44	0.34	1.11	0.45	0.24	0.27	2.88	0.24	4.63	0.26	0.78	
7	F243L	a	0.51	0.07	0.31	0.63	1.00	0.44	0.72	0.72	0.26	0.26	2.47	0.21	0.64	0.12	0.43	
8	F241L/F243L/V262I/V264I	a	0.80	0.21	0.10	0.36		24.05	8.39	6.19	0.51	0.66						
			0.51	0.10			0.49	0.57			0.06	0.48	1.24	0.20	0.44	0.19	0.10	
9	F241WF243W	a	1.13	0.07	0.81	0.59	1.39	0.38	0.96	0.54	0.09	0.21	1.88	0.27	1.12	0.12	0.20	
10	F241WF243W/V262A/V264A	a	0.50	0.12	0.28	0.58	1.33	0.32	1.06	0.53	0.28	0.21	2.13	0.19	1.91	0.15	0.15	
11	F241L/V262I	a	1.30	0.10	0.27	0.59	0.75	0.36			0.07	0.23	5.29	0.63	1.37	0.17	0.23	
12	F243L/V264I	a	1.02	0.12	0.34	0.68	0.69	0.38			0.17	0.25	3.94	0.30	0.71	0.34	1.04	
13	F243L/V262I/V264W	a	0.32	0.26	0.12	0.31		24.05	15.82	5.78	0.72	0.21						
			0.30	0.18	0.24	195	0.91	0.44	1.05	28.03	0.03	0.51						
14	F241Y/F243Y/V262T/V264T	a	0.58	0.19	0.18	0.32		24.04	30.49	5.72	0.02	0.42						
			0.66	0.23	0.25	1.97	1.17	0.35	1.01	9.71	0.55	0.24	3.72	0.62	1.35	0.42	0.60	
15	F241E/F243R/V262E/V264R	a	0.05	0.39	0.04	0.61		24.05	10.73	5.99	0.06	0.42						
			0.06	0.11			0.69	0.52	0.67	1.52	0.47	0.19	1.19	0.36	1.89	0.57	0.40	
16	F241E/F243Q/V262T/V264E	a	0.02	0.31	0.10	0.99		24.07	5.62	6.06	0.05							
			0.01	0.27			0.36	0.67			0.48	0.24	1.51	0.18	0.28	0.16	0.70	
17	F241R/F243Q/V262T/V264R	a	0.01	0.63	0.07	0.51		24.06	17.05	5.77	0.07	0.30	1.34	0.24	0.24	0.23	0.19	
			0.16	0.11	0.21	521	1.00	0.35	0.71	0.80	0.07	0.07						
18	F241E/F243Y/V262T/V264R	a	0.17	0.24	0.08	0.30		24.05	17.48	5.79	54.64							
			0.12	0.18	0.18	63.41	0.94	0.38	0.83	1.39	0.80	0.19	1.58	0.22	0.45	0.27	0.79	
19	L328M	a	2.07	5407	0.47	0.35		24.04	0.19	9.68	0.02	1.23						
			1.33	0.07	0.85	0.56	1.90	0.32	1.29	0.46	0.05	0.28	5.40	0.57	0.84	0.21	0.32	
20	L328E	a	2.17	0.17	0.07	0.34		24.04			0.21	0.34						
			1.23	0.10	0.23	124	1.90	0.33	1.07	0.54	0.62	0.22	2.55	0.36	0.73	0.31	0.38	
21	L328F	a	1.38	0.17	0.13	0.30		24.05	71.81	5.62	0.12							
			0.99	0.18	0.25	2.89	5.14	0.33	4.13	0.45	0.00	4.94	2.48	0.35	2.06	0.46		
22	I332E	atrp	3.97	0.19	1.09	0.60		1.92	0.33	1.27	0.49	0.24	4.28	0.56	1.32	0.44	1.86	
			2.08	0.13	1.26	0.21		2.37	0.37	2.64	0.34	3.57	0.19	0.78	0.41	0.52		
23	L328M/I332E	a	0.30	0.19	0.28	0.35		0.90	0.12	0.82	0.12	6.72	0.21	0.15	0.05	0.64	0.24	
												2.6						
24	P244H	a	1.05	0.34	0.53	0.67		1.02	0.42	0.79	0.68	0.64	0.23	1.42	0.26	0.46	0.14	0.62
25	P245A	a	0.84	0.11	0.46	0.65		0.70	0.52			0.83	2.00	0.26	0.44	0.27	0.64	
26	P247V	a	1.06	0.12	0.99	0.58		1.34	0.48	0.88	0.54	0.25	1.45	0.31	0.43	0.24	0.46	
27	W313F	a	0.82	0.11	0.38	0.65		0.64	0.39			0.62	0.20	1.36	0.19	0.47	0.25	0.38
												0.53						
28	P244HP245A/P247V	a	0.98	0.09	0.68	0.57		0.73	0.32			0.24	4.95	0.54	0.52	0.25	0.71	
												0.88						
29	P247G	a	1.57	0.20	0.35	0.70		0.69	0.40	0.83	8.15	0.93	1.72	0.24	0.68	0.45	0.41	
												0.28						
30	V264I/I332E	atrc	1.65	0.18	0.79	0.54		2.13	0.36	1.41	0.49	0.54	4.07	0.38	1.70	0.61	2.25	
			4.58	0.20	0.89	0.23		5.08	0.40	2.80	0.31	4.80	0.19				0.59	
							1.57*					3.00	2.82				7.96	
												12.5						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		IIIa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
31	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	a									0.19						
32	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E	a															
33	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E	a															
34	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	a									0.1						
35	S298A	a									2.21						
36	S298A/I332E	a									21.7						
37	S298A/E333A/K334A	atrp									2.56						
41	S239E/I332E	a	3.64	0.21	3.22	0.13	8.73	0.11	8.29	0.17	88.98	0.33	0.76	0.29	1.34	0.31	10.19
42	S239Q/I332E	a	2.08	0.23	1.91	0.14	3.49	0.13	3.64	0.18	5.8						1.66
43	S239E	at	2.17	0.23	1.38	0.15	3.68	0.11	3.01	0.23	13.85	0.42	1.67	0.20	1.33	0.37	3.77
44	D265G	a	0.17	0.22	1.97	0.10	4.68	0.09	3.19	0.15	6.6						1.41
45	D265N	a	0.02	0.31	0.95	0.14	2.18	0.14	0.58	0.18	51.22	0.47	0.95	0.21	1.47	0.85	23.47
46	S239E/D265G	a	0.11	0.42	0.75	0.12	10.2	0.11	0.95	0.22	4.37	0.38	0.72	0.28	1.74	0.52	0.90
47	S239E/D265N	a	0.12	0.26	0.61	0.12	<0.02	0.09	1.11	0.15	<0.02		1.30	0.55	0.31	0.48	0.28
48	S239E/D265Q	a	0.65	0.23	0.53	0.15	0.93	0.12	1.00	0.18	1.51	0.38	0.63	0.25	0.52	0.35	1.08
49	Y296E	a	1.56	0.22	1.09	0.13	1.27	0.12	1.66	0.19	0.05		1.74	0.19	0.37	0.55	
50	Y296Q	a	0.81	0.23	1.18	0.19	1.11	0.15	2.45	0.19	1.04	0.49	1.85	0.18	1.23	0.60	0.81
51	S298T	a	1.33	0.23	1.15	0.15	0.43	0.10	1.63	0.19	0.73						0.66
52	S298N	a	0.59	0.24	0.80	0.14	<0.02	0.13	0.91	0.17	2.13	0.37	1.18	0.22	0.31	0.50	0.85
53	T299I	a	0.13	0.22	0.90	0.13	1.27	0.11	0.57	0.17	0.52		1.90	0.19	2.13	0.76	1.21
54	A327S	a	0.39	0.26	0.64	0.12	<0.02	0.10	1.15	0.24	0.94		1.28	0.21	0.94	0.31	
55	A327N	a	1.25	0.32	0.77	0.16	1.26	0.11	1.00	0.18	0.41		0.80	0.24	0.34	0.36	
56	S267Q/A327S	a	0.44	0.22	0.52	0.11	0.89	0.10	1.15	0.24	<0.02	3.86	0.47	0.25	0.13	0.44	
57	S267L/A327S	a	0.35	0.23	0.64	0.14	0.39	0.10	1.31	0.17	0.23						0.59
58	A327L	a	0.53	0.28	0.55	0.21	1.07	0.10	1.31	0.17	0.61	0.40	0.66	0.32	0.88	0.38	0.57
59	P329F	a	0.33	0.25	0.93	0.16	1.15	0.09	1.91	0.17	0.19		0.88	0.22	0.71	0.51	0.17
60	A330L	ap	1.37	0.23	1.27	0.13	1.14	0.16	1.08	0.18	0.03		1.93	0.20	1.05	0.35	0.22
61	A330Y	ap	1.18	0.23	1.08	0.15	1.23	0.13	0.97	0.19	0.27	0.35	1.93	0.20	1.05	0.35	0.22
62	I332D	a	2.70	0.26	5.41	0.11	1.23	0.11	3.69	0.17	<0.02		0.89	0.25	1.55	0.52	
63	N297S	a	0.03	0.26	0.68	0.12	1.21	0.19	0.97	0.29	0.05		0.96	0.33	2.29	0.18	0.61
64	N297D	a	0.22	0.23	0.62	0.19	1.21	0.19	0.97	0.29	0.96	0.33	2.29	0.18	0.61	0.29	0.51
65	N297S/I332E	a	0.18	0.24	0.52	0.24	1.86	0.09	1.91	0.17	<0.02		0.83	0.24	0.96	0.47	0.87
66	N297D/I332E	a	1.41	0.23	0.60	0.23	0.38	0.20	0.80	0.29	0.73		0.83	0.24	0.96	0.47	1.92
67	N297E/I332E	a	0.45	0.24	0.54	0.15	1.62	0.09	1.11	0.20	1.04	0.47	2.00	0.24	0.94	0.41	0.64
68	D265Y/N297D/I332E	a	0.09	0.24	0.65	0.14	0.75	0.11	0.83	0.16	1.64		2.73	0.20	0.42	0.36	2.40
69	D265Y/N297D/T299L/I332E	a	0.33	0.22	1.63	0.13	3.76	0.11	3.69	0.17	9.03	0.36	2.73	0.20	0.42	0.36	2.40
70	D265F/N297E/I332E	a	0.01	0.29	0.79	0.13	8.32	0.39	7.11	0.29	2.85	2.82			1.75	0.39	0.34
71	L328M/I332E	a	2.79	0.11	1.44	0.17	3.34	0.11	0.68	0.23	17.8		1.77	0.23	0.38	0.55	5.33
			3.95	0.13	1.22	0.23	0.65	0.11	0.68	0.23	<0.02		1.00	0.36	1.01	0.22	0.77
							1.30	0.09	1.07	0.16	<0.02		0.89	0.19	0.19	0.52	
							0.94	0.20	0.80	0.29	<0.02		0.97	0.23	0.96	0.82	
							<0.02	0.17	0.76	0.24	0.08		0.65	0.22	0.58	0.31	
							1.16	0.11	0.83	0.16	0.31	0.38	2.78	0.21	0.25	0.33	0.27
							1.99	0.09	1.30	0.15	<0.02		1.56	0.18	0.31	0.47	
							3.32	0.39	7.11	0.29	3.15	0.40	1.33	0.21	0.63	0.57	1.58
							0.65	0.13	0.87	0.20	<0.02		1.00	0.46	1.38	0.75	3.37
							1.68	0.32	2.64	0.29	5.65	0.71	1.14	0.47	2.21	0.55	1.46
							7.61	0.24	6.59	0.25	<0.02		2.63	0.31	0.82	0.34	1.09
							11.60	0.27	7.87	0.94	12.61	0.12	2.63	0.31	0.82	0.34	1.09
											7.03						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRlla		FcyRllb		FcyRllc		FcyRllla		C1q		FcRn		Illa:Ilb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
72	L328Q/I332E	a	2.87	0.12	1.76	0.13	11.30	0.29	6.52	0.23	1.93	0.69	0.91	0.48	4.29	0.65	0.17
			2.15	0.14	1.05	0.16	15.13	0.29	7.38	0.93	1.69	0.22	1.90	0.31	0.88	0.33	0.11
											1.54						
73	I332N	a	1.64	0.20	2.96	0.14	1.43	0.32	1.82	0.26	1.70	0.71	0.98	0.52	3.20	0.54	1.19
			0.82	0.12	1.52	0.19	1.26	0.57		46.97	0.33	0.11	2.35	0.33	0.71	0.33	0.26
											0.39						
74	I332Q	a	1.49	0.33	2.70	0.16	1.10	0.28	1.10	0.29	0.67	0.70	1.10	0.49	1.07	0.51	0.61
			1.29	0.15	2.08	0.19	1.46	0.29	1.11	1.34	0.65	0.14	1.82	0.36	1.20	0.32	0.45
											0.37						
75	V264T	a	1.36	0.21	2.82	0.15	2.94	0.20	2.86	0.24	1.30	0.69	1.08	0.49	1.00	0.47	0.44
			1.25	0.15	2.50	0.16	4.84	0.21	6.12	1.16	1.73	0.10	1.42	0.33	1.66	0.35	0.36
											2.73						
76	V264F	a	0.35	0.17	0.14	0.43	0.96	0.56	0.47	0.82	0.16	0.79	1.16	0.50	0.82	0.51	0.17
			0.43	0.22	0.05	0.23	0.22	0.46			0.06	0.13	1.87	0.29	1.07	0.36	0.29
											0.16						
77	V240I	a	0.95	0.12	1.19	0.16	1.02	0.28	1.06	0.25	1.37	0.69			1.21	0.51	1.34
			1.17	0.14	0.38	22.08	1.04	0.22	0.86	0.91	0.87	0.10	2.02	0.33	1.28	0.34	0.84
											3.25						
78	V263I	a	1.39	0.31	0.61	0.21	0.68	0.60	0.94	0.42	0.15	0.71	1.11	0.49	2.71	0.73	0.22
											0.1						
79	V266I	a	1.64	0.12	1.63	0.24	3.66	0.36	3.85	1.17	1.41	0.15	1.25	0.31	1.17	0.32	0.39
											1.86						
80	T299A	a	0.01	0.18	0.10	0.25	0.56	0.48	72.84	6.18	0.06	0.37	2.31	0.32	0.82	0.33	0.11
											0.03						
81	T299S	a	0.80	0.19	0.16	0.24	2.01	0.81			0.19	0.20	1.52	0.32	0.86	0.31	0.09
											0.15						
82	T299V	a	0.02	0.20	0.14	0.20	0.21	0.50	19.44	7.11	0.21	0.14	1.92	0.41	0.35	0.31	1.03
											<0.02						
83	N325Q	a	0.65	0.17	0.07	0.23	0.26	0.42	62.17	9.35	0.04	0.57	1.92	0.34	0.69	0.34	0.16
											<0.02						
84	N325L	a	0.42	0.25	0.04	0.42	1.46	0.39		18.73	0.03	0.93	2.18	0.28	0.91	0.33	0.02
											<0.02						
85	N325I	a	0.35	0.12	0.05	0.31	0.86	0.26	0.97	1.09	0.09	0.13	2.05	0.33	0.89	0.33	0.11
											<0.02						
86	S239D	atp	4.40	0.25	1.74	0.57	6.21	0.29	5.13	0.45	6.29	0.20	3.54	0.42	1.73	0.48	1.01
			2.63	0.13	2.29	0.13	11.42	0.17	3.83	0.80	23.17	0.10	0.96	0.46	0.80	0.31	2.03
			1.86	0.13	2.17	0.22	9.04	0.37	10.98	0.28	2.55	2.82			1.07	0.41	0.28
							4.47*				11.6						2.60
87	S239N	a									<0.02						
88	S239F	a	0.28	0.17	0.02	1.14	0.33	0.68		51.36	0.10	0.24	0.95	0.43	0.85	0.34	0.30
							<0.02				0.22						
89	S239D/I332D	a	2.33	0.11	2.68	0.16	41.43	0.18	18.96	0.78	25.53	0.11	1.53	0.29	1.12	0.33	0.62
											14.1						
90	S239D/I332E	atrcp	3.89	0.12	11.57	0.15	128	0.26	145	0.99	192	0.10	1.88	0.35	1.01	0.36	1.50
			9.42	0.13	15.46	0.19	70.44	0.37	84.57	0.29	27.74	2.82			1.22	0.36	0.39
							19.71*				56.1						2.85
91	S239D/I332N	a	1.97	0.12	4.95	0.16	14.13	0.20	8.14	0.82	10.79	0.12	1.16	0.35	0.76	0.31	0.76
											7.19						
92	S239D/I332Q	a	1.81	0.21	3.05	0.33	15.24	0.19	9.75	0.91	9.41	0.09	1.28	0.32	0.64	0.35	0.62
											9.28						
93	S239E/I332D	a	4.52	0.18	1.72	0.15	10.87	0.29	30.32	1.31	21.77	0.10	2.42	0.31	1.00	0.37	2.00
											9.33						
94	S239E/I332N	a	1.62	0.12	1.81	0.16	4.55	0.23	6.01	1.16	16.86	0.13	2.00	0.32	0.88	0.33	3.71
											11.9						
95	S239E/I332Q	a	1.66	0.19	0.93	0.11	2.52	0.34	1.41	0.97	3.21	0.10	1.78	0.29	0.64	0.31	1.28
											3.8						
96	S239N/I332D	a	2.01	0.21	2.40	0.16	11.11	0.32	8.21	0.91	9.89	0.12	2.09	0.27	0.73	0.34	0.89
											3.08						
97	S239N/I332E	a	1.93	0.12	1.64	0.16	29.42	0.24	8.44	0.81	19.80	0.12	1.38	0.29	0.73	0.33	0.67
											14.2						
98	S239N/I332N	a	0.55	0.18	0.67	0.21	1.88	0.46		13.55	0.55	0.15	1.08	0.33	0.84	0.35	0.29
											0.43						
99	S239N/I332Q	a	0.73	0.13	0.72	0.17	2.55	0.35	11.03	2.16	0.59	0.11	1.88	0.29	0.73	0.33	0.23
											0.56						
100	S239Q/I332D	a	1.40	0.13	1.08	0.14	5.76	0.36	5.26	1.05	2.33	0.11	1.89	0.29	0.74	0.35	0.40
											5.05						
101	S239Q/I332N	a	0.52	0.25	0.80	0.15	1.55	0.50		10.71	0.32	0.09	2.68	0.30	1.11	0.35	0.21
											0.39						
102	S239Q/I332Q	a	0.86	0.22	0.69	0.12	1.51	0.42			0.42	0.21	1.41	0.21	1.04	0.14	0.28
											0.59						

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
103	K326E	a p	3.17	0.17	1.55	0.13	4.15	0.47			8.07	0.34	0.96	0.18			1.95
			3.41	0.11	0.79	0.24	4.99	0.41	3.68	0.31	0.25	2.82			0.82	0.38	0.05
											3.85						
104	Y296D	a	1.28	0.18	0.88	0.10	1.28	0.55			0.86	0.21	0.83	0.21	0.50	0.09	0.67
											0.62						
105	Y296N	a	0.84	0.23	0.68	0.13	1.30	0.41			0.21	0.21	0.67	0.20	0.26	0.14	0.16
											0.29						
106	F241Y/F243Y/V262T/ V264T/N297D/I332E	a	0.38	0.25	0.11	0.23					0.25	0.23	1.35	0.22	0.25	0.09	
											0.15						
107	A330Y/I332E	a	4.49	0.18	4.81	0.13	10.81	0.36			68.79	0.20	0.74	0.18	1.53	0.09	6.37
							4.4				12						2.73
108	V264I/A330Y/I332E	a	3.89	0.19	1.17	0.07	4.18	0.35			22.76	0.20	0.61	0.17	0.85	0.08	5.44
							3.54				12						3.39
109	A330L/I332E	a	4.94	0.17	1.28	0.09	3.15	0.35			55.42	0.20	0.72	0.18	1.50	0.20	17.59
							2.03				10.3						5.09
110	V264I/A330L/I332E	a	4.31	0.22	0.66	0.08	2.73	0.34			24.96	0.20	1.12	0.21	1.13	0.17	9.13
							1.79				11.2						6.23
111	L234D	a	0.36	0.30	0.40	0.13	4.95	0.35			3.89	0.21	0.96	0.21	1.54	0.16	0.79
											0.21						
112	L234E	a	0.42	0.29	0.24	0.08	4.78	0.36			1.86	0.21	1.19	0.21	1.25	0.11	0.39
							2.21				1.34						0.61
113	L234N	a	0.10	0.32	0.19	0.11	2.05	0.41			0.49	0.22	1.18	0.33	1.06	0.13	0.24
							1.39				0.56						0.40
114	L234Q	a	0.28	0.27	0.28	0.09	3.53	0.38			0.52	0.20	0.94	0.18	0.97	0.11	0.15
											0.37						
115	L234T	a	0.49	0.26	0.20	0.10	1.79	0.43			0.26	0.22	0.56	0.21	0.99	0.08	0.14
											0.35						
116	L234H	a	0.11	0.34	0.29	0.08	1.56	0.49			0.27	0.21	0.65	0.19	1.48	0.08	0.18
											0.33						
117	L234Y	a p	1.45	0.24	0.51	0.09	1.93	0.39			0.80	0.21	0.99	0.22	1.90	0.21	0.41
							1.08				1.42						1.31
118	L234I	a	1.20	0.27	0.78	0.08	2.57	0.40			1.30	0.21	1.28	0.28	1.26	0.12	0.50
							1.14				1.55						1.36
119	L234V	a	1.66	0.26	0.78	0.08	3.94	0.35			1.61	0.22	0.64	0.18	1.45	0.13	0.41
											0.38						
120	L234F	a	0.74	0.26	0.47	0.07	2.36	0.37			0.37	0.21	0.72	0.21	1.46	0.13	0.15
											0.3						
121	L235D	a p			0.76	0.09	5.48	0.37			1.61	0.20	1.05	0.17	0.90	0.15	0.29
							3.63				1.66						0.46
122	L235S	a			0.27	0.08	2.99	0.37			0.95	0.21	0.66	0.21	1.51	0.09	0.32
											1.25						
123	L235N	a	0.06	0.37	0.21	0.15	1.59	0.46			0.37	0.22	0.70	0.20	1.32	0.09	0.23
											0.4						
124	L235Q	a	0.09	0.28	0.30	0.10	1.40	0.44			1.02	0.21	0.85	0.22	1.67	0.14	0.73
											0.51						
125	L235T	a	0.13	0.26	0.53	0.11	3.55	0.34			2.15	0.21	1.06	0.23	1.65	0.38	0.60
											0.52						
126	L235H	a	0.06	0.37	0.51	0.09	1.77	0.37			0.30	0.23	0.54	0.19	0.96	0.14	0.17
											0.41						
127	L235Y	a p	0.24	0.31	3.32	0.08	4.44	0.35			1.74	0.23	0.86	0.22	1.02	0.10	0.39
			0.02	0.55	0.70	0.20	1.39	0.64	1.15	0.38	0.05	2.82			0.78	0.39	0.04
							10.15				1.19						0.12
128	L235I	a	0.16	0.26	0.67	0.10	1.24	0.55			1.47	0.26	0.68	0.21	0.81	0.10	1.18
							0.94				1.1						1.17
129	L235V	a	0.16	0.31	0.43	0.10					0.58	0.22	0.94	0.26	1.31	0.17	
			0.11	0.21	0.23	0.22	0.76	0.52	0.57	1.26	0.05	2.82			0.86	0.45	0.07
											0.48						
130	L235F	a			1.25	0.17	1.62	0.45			0.56	0.22	0.71	0.21	0.80	0.11	0.35
							3.53				0.73						0.21
131	S239T	a	0.88	0.17	0.91	0.13	1.47	0.52			0.90	0.21	0.84	0.25	1.12	0.10	0.61
											1.34						
132	S239H	a	0.08	0.10	0.11	0.38	0.20	0.65	0.23	1.24		2.04	0.88	0.24	0.72	0.11	
											0.2						
133	S239Y	a	0.19	0.12	0.12	0.34	0.69	0.48	1.88	0.42			1.70	0.23	1.08	0.13	
											0.21						
134	V240A	a	0.80	0.10	0.62	0.28	1.45	0.39	1.02	0.44	1.49	0.20	0.91	0.22	0.93	0.11	1.03
							0.14				0.7						5.00
135	V240T	a	0.92	0.12	0.67	0.30	1.20	0.46	0.13	0.97	1.16	0.16	0.78	0.23	0.46	0.69	0.96
136	V240M	a	1.60	0.07	0.67	0.30	0.94	0.55	0.68	0.68	0.86	0.22	0.74	0.21	0.93	0.09	0.92
							1.38				2.06						1.49
137	V263A	a	1.05	0.14	0.45	0.31	0.04	1.64			0.54	0.26	1.35	0.25	0.91	0.09	12.93
138	V263T	a	1.00	0.08	1.57	0.27	1.20	0.39	1.02	0.67	2.67	0.32	0.59	0.20	0.93	0.15	2.23
											0.43						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRlla		FcyRllb		FcyRllc		FcyRllla		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
139	V263M	a	0.69	0.07	0.41	0.26	1.69	0.41	1.65	0.38		3.66	1.32	0.26	0.58	0.19	
140	V264M	a	0.64	0.08	0.30	0.29	0.83	0.44	0.94	0.87	0.05	0.41	0.73	0.21	0.63	0.11	0.25
141	V264Y	a	0.51	0.08	0.32	0.29	0.57	0.44	0.81	0.59	0.21	0.29	1.19	0.22	0.75	0.12	0.52
142	V266A	a	0.61	0.12	0.30	0.28	0.76	0.64	0.06	1.67	0.26	0.29	0.95	0.22	0.71	0.12	0.80
143	V266T	a	0.28	0.12	0.10	0.32	1.16	0.48	0.18	1.05	1.02		1.21	0.24	0.53	0.14	
144	V266M	a	1.32	0.09	0.43	0.29	16.45	0.45	3.32	0.45	0.45	7.83	0.83	0.21	0.71	0.11	
			1.11	0.15	0.19	0.23	2.63	0.40	2.57	0.30	0.01	2.84			0.86	0.45	0.01
145	E269H	a	0.16	0.13	0.18	0.31	0.07	1.25	0.28	0.92	0.62	5.90	1.11	0.25	0.72	0.12	
146	E269Y	a	0.51	0.07	0.48	0.30	0.79	0.54	0.37	0.94	<0.02						
147	E269F	a	0.21	0.07	0.20	0.30	0.48	0.56	0.51	1.33	0.27	0.25	0.79	0.29	0.76	0.11	0.34
148	E269R	a	0.07	0.11	0.07	0.28	0.13	1.73	0.06	2.21	0.12		0.94	0.26	0.74	0.15	
149	Y296S	a	0.63	0.08	0.71	0.28	0.51	0.49	0.64	1.31	0.16	1.97	1.15	0.26	0.72	0.15	
150	Y296T	a	0.72	0.09	0.71	0.25	0.97	0.39	0.58	0.80	0.05		1.21	0.26	0.67	0.13	
151	Y296L	a	0.81	0.10	0.41	0.29	1.15	0.43	0.17	1.20	0.12	3.07	1.07	0.26	0.60	0.15	
152	Y296I	a	0.87	0.11	0.43	0.27	0.52	0.85	0.20	1.02	<0.02	0.19	0.53	0.20	0.62	0.12	1.08
153	S298H	a	0.58	0.10	0.23	0.31	0.09	1.22	0.18	0.86	1.24	0.24	1.51	0.26	0.56	0.11	0.67
154	T299H	a	0.03	0.09	0.16	0.29	0.44	0.48	0.33	1.23	0.35	0.24	1.51	0.26	0.56	0.11	0.67
155	A330V	a p	1.12	0.09	0.41	0.28	0.37	0.58	0.79	1.13	0.09		1.22	0.25	0.60	0.10	
156	A330I	a p	1.14	0.09	0.35	0.28	0.21	0.68	0.27	0.74	0.27	1.02	1.65	0.22	0.57	0.15	
157	A330F	a	1.65	0.12	0.89	0.29	1.19	0.47	0.32	0.87	<0.02	0.20	0.81	0.26	0.75	0.16	1.47
158	A330R	a	0.45	0.09	1.42	0.36	1.01	0.53	0.90	0.45	0.43	0.19	1.33	0.28	0.61	0.19	1.90
			0.46	0.14	1.16	0.22	1.05	0.39	1.63	0.35	0.40	0.19	1.33	0.28	0.61	0.19	85.50
159	A330H	a p	1.09	0.12	1.16	0.33	2.09	0.41	1.62	0.48	1.71	0.19	1.59	0.28	0.98	0.12	1.70
160	N325D	a	1.20	0.11	0.14	0.34	0.38	0.99			0.6	0.19	1.59	0.28	0.98	0.12	1.70
			0.87	0.12	0.14	0.34	1.62	0.44	0.63	0.54	0.45	0.22	0.74	0.22	0.58	0.14	0.45
161	N325E	a	1.34	0.10	0.09	0.38	0.05	1.35	0.03	2.06	0.07	2.82			0.95	0.42	0.07
162	N325A	a	0.31	0.06					0.05	3.84	<0.02		1.22	0.25	0.60	0.10	
163	N325T	a	0.83	0.05	0.41	0.37			0.13	3.68	0.27	1.02	1.65	0.22	0.57	0.15	
164	N325V	a	0.61	0.08	0.42	0.36			0.16	3.68	0.12	1.02	1.65	0.22	0.57	0.15	
165	N325H	a	0.52	0.08	0.25	2.55			0.13	3.68	0.11	1.02	1.65	0.22	0.57	0.15	
166	L328D/I332E	a	3.56	0.05	1.64	0.29					0.93	0.18	1.35	0.16	1.23	0.08	
167	L328E/I332E	a	2.02	0.15	0.94	0.34					1.1		1.24	0.15	1.29	0.08	
168	L328N/I332E	a	2.69	0.05	0.32	0.33			2.29	3.69	0.48	0.17	1.24	0.15	1.29	0.08	
169	L328Q/I332E	a									0.66	0.22	1.28	0.15	0.03	1.97	
170	L328V/I332E	a	3.12	0.07	0.91	0.32			8.43	3.69	0.73	0.37	1.97	0.20	1.54	0.10	
171	L328T/I332E	a	2.70	0.07	1.46	0.35			14.23	3.66	2.01	0.37	1.97	0.20	1.54	0.10	
172	L328H/I332E	a	1.26	0.08	0.32	0.36			0.44	3.67	1.34	0.37	2.59	0.20	1.44	0.11	
173	L328I/I332E	a									0.2	0.37	2.59	0.20	1.44	0.11	
174	L328A	a	0.86	0.05	10.48	0.34			0.49	3.67	10.24	0.24	1.12	0.16	1.18	0.14	
											<0.02						
											0.7						
											17.20	0.23	1.34	0.15	0.93	0.10	
											2.06						
											19.76	10.55	2.36	0.39	0.99	0.15	
											1.1						
											1.63	0.20	1.39	0.15	1.16	0.09	
											<0.02						
											3.49						
											3.81	0.30	1.23	0.19	1.32	0.09	
											0.2						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		IIa:IIb		
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf			
175	I332T	a	1.58	0.05	2.82	0.30			0.74	3.66	3.18	0.38	1.15	0.22	1.02	0.09			
176	I332H	a	1.19	0.06	2.12	0.34			0.73	3.71	0.72		1.05	0.14	2.13	0.14	1.24	0.17	
177	I332Y	a	1.88	0.07	4.18	0.29			0.63	3.68	0.46		2.14	0.16	1.53	0.21	1.43	0.17	
178	I332A	a	1.60	0.10	3.01	0.31			0.48	3.67	0.76		1.97	0.20	1.57	0.17	0.96	0.13	
179	S239E/V264I/I332E	a	4.75	0.06	1.73	0.40			2.58	3.66	0.89		142	1.57	1.45	0.18	1.07	0.24	
180	S239Q/V264I/I332E	a	2.44	0.07	0.50	0.41			0.45	3.66	15.5		21.84	0.24	1.07	0.16	0.97	0.16	
181	S239E/V264I/A330Y/I332E	a	7.52	0.12	1.80	0.32			4.69	3.66	2.14		3.18	0.27	2.05	2309	2.36	0.85	
182	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E	a	6.80	0.11	0.32	0.35			0.73	3.67	8.53		862	0.24	1.98	0.23	1.22	0.10	
183	S239D/N297D/I332E	a	2.82	0.09					0.06	3.67	0.28		0.82	0.37	3.14	0.29	0.76	0.07	
184	S239E/N297D/I332E	a	2.27	0.06							0.28		0.28	0.18	2.48	0.25	0.76	0.20	
185	N297D/I332E/S239D/D265V	a									0.06		0.03						
186	S239D/D265I/N297D/I332E	a	0.11	0.11					0.31	4.45	0.03		0.44	0.13	7.68	0.24	0.45	0.15	
187	S239D/D265L/N297D/I332E	a	0.10	0.09					0.05	3.74	0.01		0.10	0.24	2.78	0.20	0.47	0.09	
188	S239D/D265F/N297D/I332E	a	0.20	0.09					0.17	3.67	<0.02		0.54	0.35	1.47	0.13	0.62	0.08	
189	S239D/D265Y/N297D/I332E	a	0.19	0.09					0.08	3.69	<0.02		0.39	0.14	2.96	0.24	0.52	0.13	
190	S239D/D265H/N297D/I332E	a	0.09	0.09					0.12	3.68	0.02		0.51	0.23	2.16	0.23	1.26	0.24	
191	S239D/D265T/N297D/I332E	a	0.35	0.07	0.24	0.85			0.11	3.70	0.04		0.51	0.42	8.28	0.25	0.59	0.07	
192	V264E/N297D/I332E	a	0.90	0.08	0.26	0.42			0.04	3.69	<0.02		0.26	0.47	2.41	0.25	0.96	0.07	
193	N297D/I332E/Y296D	a									0.05								
194	N297D/I332E/Y296E	a									<0.02								
195	N297D/I332E/Y296N	a									0.04								
196	N297D/I332E/Y296Q	a									<0.02								
197	N297D/I332E/Y296H	a									<0.02								
198	N297D/I332E/Y296T	a									<0.02								
199	N297D/I332E/T299V	a									<0.02								
200	N297D/I332E/T299I	a									<0.02								
201	N297D/I332E/T299L	a									<0.02								
202	N297D/I332E/T299F	a									<0.02								
203	N297D/I332E/T299H	a									<0.02								
204	N297D/I332E/T299E	a									<0.02								
205	N297D/I332E/A330Y	a									0.43								
206	N297D/I332E/S298A/A330Y	a									0.16								
207	S239D/I332E/A330Y	ap									130								
208	S239N/I332E/A330Y	a									14.2								
209	S239D/A330L/I332E	atrcp	5.54	0.21	2.52	0.33		25.98	31.11	5.64	6.50								
210	S239N/I332E/A330L	a						7.5			139							18.48	
211	I332E/V264I/S298A	t									13								
212	I332E/S239D/S298A	tp						6.16			16.5								
213	I332E/S239N/S298A	t						5.15			295							47.92	
214	S239D/I332E/V264I	t						14.39			32.1							6.24	
215	S239D/I332E/V264I/S298A	t									36.6							2.54	
216	S239D/I332E/V264I/A330L	t																	
217	L328N	a									0.59								
218	L328H	a									<0.02								
219	S239D/I332E/A330I	ap									59.1								
220	N297D/I332E/S239D/A330L	a																	
221	P230A	t	1.28	0.13	0.99	0.18		1.13	39.94		0.55	0.20	2.53	0.25	0.77	0.19	0.49		
222	E233D	t	0.85	0.15	0.81	0.16		1.05	1.12		1.09		0.64	0.18	2.66	0.36	0.76	0.23	0.61
223	P230A/E233D	t	2.03	0.22	0.76	0.13					0.85		0.54	0.17	2.04	0.27	0.84	0.18	
224	P230A/E233D/I332E	t	4.92	0.16	0.97	0.16		2.01	0.90		0.92		7.81	0.14	3.64	0.35	0.78	0.16	3.88
											1.87								

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
225	S267T	t	0.93	0.14	0.15	0.32	1.06	1.26	1.01	450	0.86	0.18	3.09	0.28	0.75	0.19	0.81
226	S267H	t	0.34	0.15	0.16	0.23	0.93	14.97			0.34	0.23	3.26	0.28	0.57	0.23	0.36
227	S267D	tp	1.41	0.13	0.75	0.09	5.02	0.89	4.78	75.92	1.45	0.11	2.88	0.18	1.00	0.20	0.29
228	S267N	t	0.72	0.20	0.08	0.71					0.27	0.19	3.18	0.34	0.85	0.16	
229	E269T	t	0.32	0.16	0.20	0.31					0.14	0.60	1.17	0.20	0.92	0.18	
											<0.02						
230	E269L	t	0.28	0.15	0.16	0.24							1.83	0.29	0.75	0.21	
											<0.02						
231	E269N	t	0.19	0.15	0.12	0.38							1.36	0.27	0.65	0.22	
											<0.02						
232	D270Q	t	0.51	0.22	0.42	0.19					0.30	0.19	2.41	0.24	0.76	0.18	
											<0.02						
233	D270T	t	0.33	0.22	0.16	0.23					0.16	1.68	2.50	0.27	0.84	0.17	
											<0.02						
234	D270H	t	0.33	0.18	0.24	0.17							1.45	0.28	0.85	0.19	
											<0.02						
235	E272S	t	1.04	0.20	0.53	0.25	1.15	4.37	1.07	6.40	0.39	0.20	1.28	0.31	0.90	0.23	0.34
236	E272K	t	0.79	0.19	0.55	0.10	1.85	0.30	1.33	0.35	3.41	0.19	1.09	0.30	0.96	0.18	1.84
237	E272I	tp	0.83	0.16	0.72	0.12	1.04	0.40	1.11	2.20	4.96	0.16	1.48	0.31	1.05	0.20	4.79
238	E272Y	t	0.58	0.16	0.80	0.09					0.78	0.17	1.68	0.32	2.08	0.26	
											8.7						
239	V273I	t	0.98	0.17	0.55	0.09	2.20	0.31	1.62	0.34	0.60	0.17	1.11	0.37	0.95	0.28	0.27
											0.79						
240	K274T	t	1.01	0.24	0.82	0.08			1.10	13.52	0.90	0.19	1.55	0.33	1.08	0.42	
											1.41						
241	K274E	tp	1.46	0.13	0.86	0.11	1.17	0.29	1.07	0.50	1.00	0.12	2.73	0.37	1.05	0.27	0.86
											6.11						
242	K274R	tp	0.95	0.16	0.77	0.11			0.85	0.56	0.71	0.17	2.22	0.35	0.65	0.23	
											1.41						
243	K274L	t	1.17	0.15	0.91	0.11	1.71	0.30	1.41	0.37	4.35	0.15	1.15	0.30	0.51	0.24	2.54
											1.09						
244	K274Y	tp	1.02	0.16	0.79	0.11	1.09	0.37	1.16	10.90	0.93	0.13	1.42	0.33	0.63	0.25	0.85
											1.06						
245	F275W	t	1.16	0.17	0.57	0.10	1.15	0.37	1.09	0.48	1.51	0.14	1.49	0.34	0.90	0.23	1.31
											1.11						
246	N276S	tp	0.84	0.15	0.62	0.09	0.97	0.46	1.24	25.25	0.71	0.19	2.00	0.32	0.67	0.21	0.74
											0.41						
247	N276E	t	2.07	0.15			1.29	2.40			0.24	0.19					0.19
											0.87						
248	N276R	t	0.84	0.22	0.64	0.11	0.87	0.50	1.26	21.80	0.51	0.19	1.43	0.35	1.19	0.31	0.59
											0.66						
249	N276L	tp	0.65	0.29	0.66	0.10	0.94	0.41	1.10	10.72	0.52	0.22	1.37	0.36	1.21	0.43	0.56
											1.07						
250	N276Y	t	1.23	0.16	1.18	0.09	3.02	0.29	2.97	0.31	3.47	0.10	1.34	0.31	0.74	0.18	1.15
											0.56						
251	Y278T	t	0.73	0.17	0.35	0.10	0.71	0.55	1.08	2.80	0.34	0.18	1.55	0.30	0.55	0.18	0.48
											1.87						
252	Y278E	tp	2.11	0.15	0.59	0.14	1.09	0.35	1.04	0.76	0.54	0.13	1.43	0.33	0.61	0.30	0.49
											0.9						
253	Y278K	t	0.63	0.24	0.45	0.14	1.12	4.55	1.02	5.44	0.37	0.17	1.18	0.30	0.78	0.20	0.34
254	Y278W	t	0.65	0.15	0.45	0.10	0.83	0.93	1.06	15.47	0.31	0.16	1.40	0.35	0.74	0.22	0.38
											0.41						
255	E283R	t	0.67	0.14	0.62	0.08	0.91	0.70	1.11	3.27	0.49	0.14	1.36	0.32	1.86	0.18	0.54
											0.67						
256	V302I	t	0.75	0.20	0.66	0.11	1.20	0.41	1.08	0.44	0.81	0.15	1.13	0.35	2.44	0.24	0.68
											1.01						
257	E318R	t	0.71	0.35	0.57	0.13	1.14	6.22			0.50	0.19	1.83	0.34	1.17	0.36	0.44
											1.06						
258	K320T	tp	1.37	0.41	1.10	0.16	1.23	0.29	0.91	0.33	1.53	0.13	1.12	0.34	0.56	0.19	1.25
259	K320D	t	2.29	0.14	0.79	0.19	1.37	0.29	1.06	0.35	0.70	0.21	1.80	0.35	0.58	0.19	0.51
260	K320I	tp	1.87	0.13	0.99	0.15	1.65	0.27	1.21	0.37	1.84	0.20	1.69	0.36	0.72	0.25	1.12
261	K322T	tp	1.64	0.16	0.56	0.16	1.14	0.32	1.08	1.26	0.94	0.18	1.48	0.31	0.83	0.21	0.83
262	K322H	tp	1.20	0.17	0.66	0.14	0.92	0.52	1.20	3.35	0.71	0.13	1.32	0.36	0.77	0.22	0.77
263	V323I	t	0.90	0.13	0.74	0.13	1.64	0.33	1.29	0.35	0.97	0.12	1.81	0.31	0.99	0.22	0.59
											0.83						
264	S324T	tp	2.07	0.28	1.29	0.09	1.15	0.08	1.15	0.06	2.37	0.36	2.15	0.09			2.07
			1.03	0.23	0.89	0.09	1.00	0.42	1.13	1.80	1.11	0.19	1.60	0.40	1.07	0.26	1.12
265	S324D	tp	3.36	0.25	1.71	0.11	1.25	0.08	1.31	0.07	1.54	0.35	1.71	0.08			1.23
			0.94	0.20	1.03	0.10	0.93	0.67			0.75	0.18	1.46	0.33	1.27	0.44	0.80
											1.07						
266	S324R	t	2.67	0.27	1.18	0.15	1.39	0.10	2.52	0.33	1.86	0.38	1.23	0.08			1.34
			0.64	0.16	0.73	0.17					0.56	0.17	2.06	0.19	0.61	0.37	
											0.71						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
267	S324I	tp	9.07	0.25	1.98	0.15	6.71	0.34	7.80	0.30	1.88	0.30	0.69	0.12			0.28
			1.43	0.17	0.69	0.10					0.54	0.16	2.02	0.21	0.90	0.20	
											1.15						
268	S324V	tp	2.47	0.24	1.96	0.08	1.88	0.09	1.94	0.07	2.25	0.36	0.90	0.10			1.19
			2.12	0.16	1.32	0.23	1.01	0.98	1.03	76.44	1.06	0.19	1.66	0.19	0.90	0.19	1.05
											1.17						
269	S324L	tp	2.01	0.26	1.95	0.07	1.22	0.08	1.24	0.06	2.28	0.38	0.62	0.08			1.86
			0.93	0.14	0.96	0.13	0.93	1.00	0.90	79.37	0.74	0.14	1.71	0.19	0.82	0.22	0.79
											<0.02						
270	S324Y	t	1.89	0.25	1.53	0.06	1.48	0.07	1.40	0.06	1.86	0.44	1.83	0.10			1.26
			1.51	0.13	0.86	0.09	0.97	1.05			0.89	0.14	2.25	0.23	0.76	0.21	0.91
											0.98						
271	K326L	tp	2.19	0.26	1.50	0.09	1.40	0.08	1.37	0.04	3.20	0.28	1.13	0.08			2.29
			2.66	0.19	0.70	0.18	1.55	0.91	1.79	75.92	1.54	0.17	1.64	0.20	0.70	0.19	1.00
272	K326I	t	2.79	0.25	1.62	0.09	1.39	0.07	1.41	0.05	3.12	0.31	1.06	0.09			2.24
			2.10	0.17	0.67	0.17	1.79	0.92	1.69	75.92	1.68	0.15	2.49	0.21	0.65	0.20	0.94
											1.43						
273	K326T	tp	4.10	0.26	2.07	0.12	1.95	0.07	2.05	0.06	2.75	0.36	2.25	0.11			1.41
			2.92	0.19	1.26	0.13	1.33	0.91	1.06	75.92	1.79	0.14	2.65	0.21	0.68	0.22	1.34
											1.88						
274	A327D	t	15.80	0.25	2.09	0.19	7.30	0.36	11.30	0.39	3.34	0.24	0.62	0.17			0.46
			2.55	0.13	0.73	0.16	1.62	0.89	1.11	75.92	0.51	0.14	3.00	0.21	1.01	0.18	0.32
											<0.02						
275	A327T	t	1.13	0.25	0.82	0.15	1.06	0.08	1.15	0.06	0.65	0.27	2.64	0.08			0.62
			0.19	0.19	0.13	1.18							2.63	0.29	0.67	0.17	
											<0.02						
276	A330S	tp	4.00	0.25	1.58	0.13	1.91	0.09	1.84	0.11	1.56	0.36	1.88	0.07			0.81
			2.38	0.19	0.80	0.21	0.97	1.11			0.67	0.18	1.64	0.24	0.91	0.21	0.69
277	A330W	t	3.94	0.25	1.33	0.07	1.45	0.08	1.49	0.06	1.37	0.38	1.96	0.08			0.94
			2.14	0.16	0.37	0.17	1.00	8.31			0.76	0.19	2.44	0.23	1.02	0.19	0.76
278	A330M	t	2.30	0.25	1.36	0.09	1.26	0.07	1.09	0.05	1.79	0.38	1.91	0.08			1.42
			2.01	0.15	0.53	0.14	1.15	17.59			1.00	0.15	2.31	0.22	0.77	0.24	0.87
279	P331V	t	2.52	0.24	1.01	0.06	1.30	0.07	1.36	0.05	1.19	0.29	2.12	0.08			0.92
			1.43	0.13	0.34	0.18	0.88	1.06	0.93	76.26	0.26	0.22	3.49	0.18	0.83	0.19	0.29
280	P331H	t	2.28	0.26	1.40	0.09	1.27	0.08	1.34	0.05	1.12	0.29	2.24	0.07			0.88
			2.09	0.46	0.43	0.18	1.24	0.93	0.95	76.55	0.35	0.18	2.86	0.25	0.90	0.22	0.28
281	E333T	t	2.46	0.26	1.43	0.11	1.27	0.08	1.22	0.05	1.77	0.34	1.68	0.75			1.39
			1.21	0.16	0.68	0.12	1.05	1.34	0.98	454	0.72	0.15	3.17	0.21	0.85	0.18	0.68
											0.78						
282	E333H	t	2.91	0.25	1.23	0.09	1.24	0.11	1.30	0.06	1.77	0.34	2.21	0.12			1.43
			0.40	0.06	0.59	0.33	1.19	0.46	0.73	0.32	0.46	0.17	1.06	0.73	0.84	0.29	0.39
											0.75						
283	E333I	t	2.60	0.26	1.53	0.11	1.78	0.09	2.10	0.07	1.94	0.34	2.55	0.07			1.09
			0.34	0.13	0.58	0.40	1.72	0.30	0.93	0.23	0.38	0.11	1.52	0.60	0.84	0.26	0.22
284	E333Y	t	7.61	0.25	2.51	0.10	10.60	0.17	11.60	0.21	8.70	0.23	1.10	0.14			0.82
			0.45	0.11	0.64	0.32	1.93	0.31	0.88	0.29	0.90	0.15	0.81	0.94	0.83	0.27	0.47
285	K334I	t	3.99	0.25	1.82	0.07	1.67	0.05	1.60	0.05	10.32	0.28	1.84	0.08			6.18
			0.97	0.15	0.85	0.36	1.89	0.33	1.00	0.28	2.47	0.11	1.16	0.72	0.64	0.27	1.31
286	K334T	tp	3.63	0.26	2.15	0.07	0.93	0.38	0.96	0.06	5.35	0.36	1.03	0.10			5.75
			1.24	0.25	0.98	0.31	2.28	0.30	1.39	0.23	1.69	0.13	1.06	0.80	0.82	0.29	0.74
287	K334F	t	4.03	0.25	1.57	0.10	1.26	0.07	1.15	0.05	5.47	0.42	2.70	0.08			4.33
			1.54	0.11	0.75	0.29	1.77	0.32	0.92	0.23	1.46	0.12	1.01	1.00	0.77	0.26	0.83
288	T335D	tp	3.52	0.28	1.68	0.13	1.21	0.07	1.13	0.07	3.03	0.33	1.93	0.09			2.51
			1.37	0.07	0.82	0.26	1.37	0.30	0.66	0.32	0.96	0.14	1.25	0.67	0.99	0.24	0.70
											2.79						
289	T335R	t	2.72	0.26	1.28	0.09	1.23	0.10	1.22	0.07	1.47	0.33	2.06	0.15			1.19
			0.38	0.07	0.66	0.26	1.23	0.31	0.66	0.30	0.38	0.12	1.00	0.70	0.74	0.26	0.31
											2.58						
290	T335Y	tp	2.72	0.28	1.48	0.09	1.23	0.06	1.19	0.05	2.29	0.37	3.22	0.11			1.86
			0.46	0.10	0.70	0.37	0.81	0.62	0.62	0.41	0.52	0.12	1.31	0.69	0.86	0.26	0.64
											1.56						
291	L234I/L235D	t	0.81	0.32	2.20	0.09	0.96	0.10	0.89	0.06	3.68	0.37	0.60	0.12			3.82
			0.04	0.15	0.25	2.73	1.14	0.34	0.52	0.25	0.57	0.12	2.07	0.60	1.03	0.25	0.50
											0.07						
292	V240I/V266I	t	3.99	0.24	1.86	0.09	1.99	0.11	1.90	0.06	3.42	0.35	3.08	0.07			1.71
			0.60	0.12	0.46	0.32	1.91	0.37	1.05	0.27	0.52	0.14	1.16	0.73	0.81	0.25	0.27
											1.72						
293	S239D/A330Y/I332E/L234I	t									22.4						
294	L235D/S239D/A330Y/I332E	t	5.43	0.28	1.62	0.06	1.59	0.06	1.35	0.06	65.84	0.29	1.16	0.09			41.38
			0.15	0.12	0.34	0.35	7.07	0.30	3.66	0.26	80.04	0.11	1.11	0.83	0.78	0.28	11.33
											7.04						
295	S239D/V240I/A330Y/I332E	t	2.64	0.13	2.78	0.25	21.68	0.29	13.70	0.22	115	0.13	0.99	0.90	0.71	0.27	5.33
											28						

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRlla		FcyRllb		FcyRllc		FcyRllla		C1q		FcRn		Illa:Ilb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
296	S239D/V264T/A330Y/I332E	t	1.64	0.10	4.85	0.26	22.14	0.30	14.88	0.23	59.09	0.11	0.89	1.07	0.98	0.25	2.67
297	S239D/A330Y/I332E/V266I	t									17.7						
298	S239D/K326E/A330Y/I332E	tp	3.21	0.08	3.00	0.26	48.74	0.30	27.56	0.23	298	0.12	1.20	0.66	0.39	0.27	6.12
299	S239D/K326T/A330Y/I332E	t	1.83	0.08	8.89	0.22	41.48	0.29	22.59	0.22	64.1						
300	S239D/N297D/A330Y/I332E	t	0.10	0.13			0.23	1.70	0.85	11.57	185	0.10	1.27	0.60	0.40	0.28	4.47
301	S239D/F241S/F243H/V262T/V264T/N297D/A330Y/I332E	t	0.08	0.11			0.90	0.87	0.84	9.38	59						
302	L235D/S239D/N297D/I332E	t	0.02	0.20							<0.02						
303	S239D/N297D/K326E/I332E	t	0.23	0.10			0.81	0.68	0.57	0.34	<0.02						
321	P232E	a	2.97	0.14	0.80	0.14	1.59	0.21	0.99	0.23	0.08	0.48	1.10	0.78	0.19	0.59	
322	P232K	a	0.18	0.19	0.06	0.38	0.27	0.20	0.30	0.16	0.36	0.13	1.33	0.66	0.19	0.63	0.45
323	P232Y	a	0.70	0.14	0.87	0.16	0.85	0.17	0.61	0.24	1.51	0.36	1.18	0.16	0.76	0.23	0.95
324	P232G	a	0.07	0.25	0.05	0.45	0.27	0.17	0.33	0.20	0.32	0.16	0.08	0.59			1.19
325	S239Q	a	1.91	0.21	1.51	0.12	1.49	0.19	0.96	0.28	0.77	0.39	0.78	0.18	1.56	0.30	0.91
326	S239K	a	0.15	0.16	0.22	0.32	0.54	0.14	0.74	0.19	0.20	0.15	0.07	0.60			0.72
327	S239R	a	1.31	0.18	0.49	0.13	0.69	0.18	0.42	0.23	0.99	0.34	0.87	0.18	0.68	0.26	0.66
328	S239V	a	0.10	0.19	0.05	0.41	0.11	0.30	0.01	1.67	0.21	0.13	0.16	0.61			0.40
329	S239L	ap	0.98	0.15	1.05	0.12	1.11	0.25	0.59	0.24	0.04	0.22	0.14	0.60			0.36
330	S239I	a	0.07	0.21	0.09	0.34	0.68	0.16	0.91	0.21	1.59	0.31	0.81	0.15	0.57	0.22	1.44
331	S239M	a	0.18	0.12	0.94	0.11	0.76	0.22	0.43	0.23	0.92	0.11	0.17	0.59			1.35
332	S239W	a	0.02	0.16	0.14	0.29	0.78	0.17	0.94	0.17	1.20	0.36	0.98	0.15	0.86	0.27	1.58
333	S239P	a	0.05	0.14	0.41	0.14	0.51	0.16	0.19	0.37	0.88	0.14	0.49	0.86			1.12
334	S239G	a	0.01	0.15			0.08	0.63	0.00	2.30	0.11	0.28	1.29	0.18	1.04	0.20	0.22
335	F241D	a	0.08	0.19	0.36	0.26	2.49	0.16	1.98	0.15	0.12	0.58					0.44
336	F241E	a	1.28	0.19	0.29	0.22	1.92	0.49	1.23	0.32	1.10	0.14	0.36	0.65			0.02
337	F241Y	a	0.99	0.16	3.98	0.13	6.06	0.22	3.69	0.22	0.05	2.82			1.17	0.36	0.02
338	S267E	ap	0.00	0.20			0.10	0.35	0.14	0.27	4.49	0.25	6.30	0.19	4.60	0.25	0.74
339	S267Q	ap	0.06	0.18	0.57	0.17	1.47	0.19	0.87	0.26	0.13	0.25	1.28	0.16	0.71	0.29	0.09
340	S267K	a	0.14	0.15	0.10	0.35	0.16	0.24	0.07	0.62	0.05	0.14	0.11	0.60			0.34
341	S267R	a	0.90	0.12	0.81	0.16	1.02	0.17	0.91	0.33	0.64	0.29	1.36	0.16	1.03	0.26	0.63
342	S267V	a	0.05	0.16	0.05	25.50	0.01	2.15	0.03	5.02	0.03	0.17	0.20	0.61			6.26
343	S267L	a	0.43	0.13	0.52	0.16	0.49	0.17	0.38	0.23	0.45	0.28	1.53	0.15	0.57	0.27	0.92
344	S267I	a	0.04	0.16	0.04	13.71	0.11	0.40	0.02	1.84	0.02	0.22	0.15	0.59			0.16
345	S267F	a	0.27	0.16	0.63	0.15	0.91	0.18	0.73	0.23	0.19	0.30	0.96	0.15	0.30	0.30	0.21
346	S267M	a	0.15	0.15	0.16	0.30	0.82	0.15	0.55	0.30	0.04	0.19	0.13	0.58			0.05
347	S267Y	a	1.20	0.14	0.97	0.14	1.80	0.14	1.31	0.23	0.47	0.30	0.91	0.16	1.16	0.38	0.26
348	S267W	a	0.08	0.16	0.05	0.33	0.05	0.50	0.09	0.58	0.03	0.18	0.30	0.81			0.69
349	S267P	a	1.76	0.18	1.37	0.12	1.36	0.14	0.86	0.21	0.60	0.29	0.78	0.16	0.69	0.26	0.45
			0.15	0.16	0.08	0.33	0.09	0.50	0.11	0.63	0.03	0.13	0.13	0.60			0.34
			0.96	0.15	1.90	0.11	1.18	0.17	1.02	0.23	0.57	0.33	1.10	0.16	1.09	0.19	0.48
			0.14	0.16	0.16	0.28	0.33	0.17	0.29	0.13	0.09	0.15	0.07	0.63			0.29
			1.33	0.15	1.15	0.13	2.04	0.17	1.51	0.22	1.04	0.28	1.23	0.23	0.74	0.27	0.51
			0.15	0.17	0.05	152	0.68	0.16	0.55	0.17	0.27	0.13	0.06	0.58			0.40
			4.43	0.16	4.76	0.18	337	0.42	248	0.39	1.30	0.33	21.33	0.17	0.20	0.28	0.00
			2.39	0.21	5.92	0.13	97.52	0.21	438	0.49	1.18	0.39	30.15	0.14	1.09	0.19	0.01
			3.50	0.16	11.50	0.20	335	0.37	1321	0.28	0.65	2.82			2.24	0.39	0.00
			1.01	0.12	0.67	0.21	2.03	0.17	1.50	0.23	0.74	0.40	1.14	0.17	0.65	0.27	0.36
			0.02	0.14			0.14	0.24	0.05	0.84			3.25	0.19	0.61		
			0.32	0.19	1.65	0.14	1.25	0.23	0.69	0.25	0.30	0.24	0.96	0.18	1.70	0.35	0.24
			0.02	0.16			0.01	1.29	0.02	79.64			0.14	0.60			
			0.15	0.15	0.45	0.19	0.36	0.17	0.17	0.24	0.16	0.24	1.03	0.15	0.75	0.30	0.44
			0.12	0.18	0.05	283	1.18	0.19	1.38	0.22			0.14	0.60			
			1.21	0.16	0.81	0.13	3.26	0.16	2.35	0.22	0.17	0.25	1.38	0.16	0.50	0.33	0.05
			0.09	0.14			0.35	0.33	0.24	0.45	0.01	0.72	0.15	0.62			0.04
			0.82	0.15	0.90	0.12	1.29	0.18	1.22	0.22	0.16	0.25	0.90	0.15	0.96	0.27	0.13
			0.10	0.12			0.92	0.17	1.18	0.14	0.02	0.05	0.39	0.84			0.02
			0.76	0.15	0.55	0.13	2.81	0.18	2.07	0.22	0.13	0.28	1.23	0.16	0.63	0.29	0.04
			0.03	0.13			0.04	0.63	0.03	1.06			6.12	0.12	0.60		
			0.40	0.17	0.54	0.13	0.71	0.16	0.61	0.25	0.22	0.24	0.87	0.23	0.42	0.34	0.30
			0.18	0.16			0.51	0.17	0.66	0.19	0.02	0.23	0.09	0.65			0.04
			2.16	0.12	0.91	0.13	2.46	0.23	1.73	0.28	0.44	0.26	1.11	0.18	0.48	0.33	0.18
			0.03	0.14			0.07	0.44	0.09	0.74			0.07	0.63			
			0.37	0.13	1.28	0.20	0.95	0.23	0.60	0.30	0.35	0.28	1.10	0.18	0.93	0.33	0.37
			0.05	0.15			0.12	0.33	0.01	1.75			0.10	0.61			
			0.48	0.16	0.48	0.28	1.09	0.17	0.38	0.27	0.18	0.24	1.36	0.16	0.36	0.33	0.17
			0.02	0.16			0.00	1.59	0.00	5.22	0.02	0.18	0.12	0.62			7.37
			0.27	0.14	0.58	0.14	0.97	0.15	0.50	0.24	0.49	2.27	1.42	0.16	0.35	0.35	0.50
			0.51	0.16	0.79	0.29	2.99	0.16	3.81	0.15	0.56	0.14	0.11	0.62			0.19

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		IIIa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
350	H268D	a	3.92	0.13	7.02	0.12	12.81	0.17	9.43	0.22	4.97	0.29	1.89	0.17	0.43	0.48	0.39
			0.29	0.13	0.71	0.23	4.42	0.14	5.80	0.20	0.80	0.13	0.29	0.60			0.18
351	H268E	a p	3.25	0.14	5.03	0.14	7.91	0.19	6.42	0.25	4.42	0.27	1.40	0.15	1.71	0.39	0.56
352	H268Q	a	2.13	0.43	1.26	0.12	1.70	0.15	2.05	0.14	1.38	0.49	0.79	0.42	0.98	0.22	0.81
353	H268K	a	0.87	0.40	0.58	0.13	0.38	0.17	0.37	0.11	0.47	0.49	0.50	0.32	0.54	0.25	1.25
354	H268R	a	0.80	0.43	0.55	0.13	0.51	0.12	0.32	0.17	0.41	0.54	0.64	0.39	0.67	0.21	0.79
355	H268T	a	2.20	0.45	0.78	0.09	0.57	0.14	0.39	0.15	0.57	0.68	0.49	13.14	0.68	0.29	1.00
356	H268V	a	2.61	0.44	1.03	0.10	0.85	0.15	0.51	0.14	0.58	0.49	0.38	0.49	0.63	0.26	0.68
357	H268L	a	1.33	0.40	0.46	0.13	0.45	0.13	0.31	0.11	0.65	0.49	1.12	0.39	0.39	0.26	1.46
358	H268I	a	3.69	0.43	0.49	0.08	0.61	0.12	0.37	0.13	0.53	0.48	0.52	0.34	0.93	0.23	0.86
			0.43	0.23			1.04	0.85	0.72	15.94	0.07	2.82			0.54	0.42	0.07
359	H268F	a	2.70	0.41	2.13	0.09	0.98	0.12	0.86	0.12	1.44	0.49	2.12	0.42	0.40	0.25	1.48
360	H268M	a	1.15	0.13	0.50	0.24	1.08	0.46	0.73	0.36	0.43	2.82			1.88	0.40	0.40
361	H268W	a	1.41	0.43	0.88	0.11	2.63	0.35	1.29	0.14	0.56	0.66	1.41	0.40	0.35	0.23	0.21
362	H268P	a	1.78	0.40	0.35	0.14	0.91	0.14	0.71	0.12	0.57	0.49	0.67	0.41	0.68	0.16	0.63
363	H268G	a p	2.41	0.42	0.99	0.14	1.38	0.13	1.58	0.08	0.84	0.50	1.11	0.40	0.38	0.19	0.61
364	S298D	a	2.96	0.40	0.20	0.21	0.30	0.12	0.15	0.16	0.66	0.50	1.06	0.42	0.55	0.18	2.24
365	S298E	a	3.36	0.39	0.25	0.19	0.26	0.14	0.17	0.27	0.19	0.50	0.97	0.43	0.31	0.18	0.74
			1.90	0.21	0.09	3.80	0.58	0.44	0.63	0.53	0.04	2.83			1.54	0.37	0.06
366	S298Q	a	1.82	0.40	0.49	0.08	0.87	0.09	0.78	0.10	0.59	0.49	0.66	0.48	0.45	0.19	0.68
367	S298K	a	0.33	0.39	0.21	0.16	0.39	0.15	0.29	0.16	0.14	0.48	0.78	0.28	0.54	0.17	0.36
368	S298R	a	0.86	0.40	0.30	0.12	0.17	0.24	0.13	0.26	0.24	0.48	0.92	0.41	0.48	0.16	1.38
369	S298I	a	3.25	0.40	0.44	0.22	0.69	0.16	0.56	0.16	0.94	0.49	1.54		0.13	0.23	1.36
370	S298F	a	3.35	0.39	1.05	0.15	2.57	0.10	1.48	0.13	1.50	0.48	1.20	0.28	0.25	0.16	0.58
			2.42	0.10	0.16	0.29	0.93	0.42	0.55	0.72	0.08	2.82			1.15	0.38	0.09
371	S298M	a	3.34	0.42	1.76	0.13	2.53	0.12	1.73	0.11	1.24	0.49	1.40	0.62	0.60	0.21	0.49
372	S298Y	a	2.51	0.41	0.54	0.15	0.68	0.11	0.49	0.19	0.98	0.50	0.91	0.49	0.50	0.19	1.43
373	S298W	a	2.46	0.40	0.31	0.16	0.32	0.21	0.22	0.19	0.32	0.48	0.80	0.46	0.23	0.25	0.98
374	T299D	a	0.12	0.41	0.26	0.16	0.26	0.19	0.22	0.12	0.18	0.50	1.50	1.25	0.44	0.34	0.67
375	T299E	a	0.24	0.40	0.39	0.08	0.37	0.14	0.28	0.15	0.28	0.48	1.07	0.29	0.47	0.18	0.76
376	T299N	a	0.22	0.42	0.33	0.21	0.36	0.15	0.27	0.18	0.21	0.48	1.90	0.39	0.61	0.26	0.60
377	T299Q	a	0.15	0.40	0.19	0.39	0.11	0.22	0.16	0.22	0.17	0.48	1.16	0.39	0.25	0.27	1.50
378	T299K	a	0.04	0.54	0.58	0.29	0.30	0.18	0.27	0.16	0.10	0.49	0.50	0.31	0.49	0.15	0.35
379	T299R	a	0.02	0.99	0.23	0.41	0.20	0.36	0.08	0.42	0.00	24.61	0.61	0.41	0.44	0.21	0.00
380	T299L	a	0.26	0.44	0.18	0.30	0.58	0.22	0.43	0.09	0.06	0.59	0.60	12.53	0.34	0.19	0.11
381	T299F	a	0.61	0.43	1.77	0.26	0.95	0.17	0.33	0.20	0.12	0.49	1.31	0.47	1.86	0.20	0.12
382	T299M	a	0.17	0.44	0.21	0.24	0.85	0.13	0.46	0.12	0.06	0.66	0.85	0.33	0.36	0.23	0.08
383	T299Y	a	0.03	0.38	0.77	0.26	0.86	0.27	0.62	0.21	0.11	0.20	1.66	0.38	3.85	0.13	0.13
384	T299W	a	0.09	0.32	0.31	0.20	0.85	0.18	0.59	0.12	0.20	0.13	1.46	0.33	1.09	0.10	0.24
385	T299P	a	0.02	0.36	0.20	0.16	0.34	0.17	0.26	0.17	0.10	0.23	2.60	0.36	0.72	0.11	0.29
386	T299G	a	0.02	0.45	0.15	0.29	0.24	0.21	0.09	0.23	0.03	0.61	1.94	0.52			0.12
387	Y300D	a p	1.58	0.32	0.67	0.08	1.68	0.15	1.37	0.16	1.19	0.15	3.22	0.46	0.97	0.10	0.71
388	Y300E	a	0.12	0.37	0.10	0.33	0.22	0.17	0.11	0.20	0.06	0.24	2.51	0.37	0.82	0.12	0.26
			1.53	0.17	1.00	0.23	3.51	0.40	2.95	0.30	0.14	2.82			1.27	0.41	0.04
389	Y300N	a	1.87	0.44	0.98	0.08	11.42	2509	0.56	0.12	0.63	0.14	0.88	0.38	1.14	0.10	0.06
390	Y300Q	a	0.86	0.31	1.02	0.07	1.71	0.15	1.88	0.12	1.22	0.14	2.29	0.42	1.11	0.12	0.71
391	Y300K	a	0.42	0.29	0.48	0.11	0.54	0.17	0.50	0.13	0.58	0.13	1.14	0.34	1.01	0.18	1.08
392	Y300R	a	0.41	0.38	0.35	0.11	0.57	0.16	0.57	0.14	0.41	0.14	2.12	0.32	0.86	0.13	0.72
393	Y300S	a	0.72	0.31	0.73	0.10	0.48	0.15	0.46	0.14	0.59	0.15	2.79	0.41	0.80	0.14	1.25
394	Y300T	a p	1.16	0.27	0.87	0.11	1.31	0.16	1.18	0.13	2.80	0.15	17.00	0.51			2.14
395	Y300H	a	1.23	0.31	1.23	0.08	3.85	0.13	3.86	0.12	1.31	0.14	3.90	0.45	0.81	0.14	0.34
			1.64	0.13	0.78	0.25	1.47	0.46	0.92	0.36	0.06	2.82			0.80	0.38	0.04
396	Y300A	a	1.16	0.32	0.63	0.08	0.74	0.12	0.55	0.12	0.75	0.13	1.64	0.26	1.04	0.14	1.01
397	Y300V	a	0.80	0.38	1.19	0.10	0.83	0.12	1.07	0.12	0.84	0.14	1.72	0.42	1.09	0.19	1.02
398	Y300M	a	1.32	0.30	1.22	0.11	0.89	0.14	0.84	0.13	1.00	0.19	1.85	0.48	1.10	0.14	1.13
399	Y300W	a	0.68	0.31	0.82	0.10	1.10	0.13	0.99	0.15	1.01	0.14	1.55	0.36	0.96	0.15	0.93
400	Y300P	a	0.11	0.28	0.54	0.13	0.61	0.17	0.47	0.13	0.90	0.12	1.93	0.30	0.61	0.14	1.48
401	Y300G	a	0.83	0.33	0.62	0.16	0.67	0.12	0.64	0.12	0.80	0.13	2.96	0.41	1.07	0.12	1.20
402	A330E	a p	3.27	0.30	0.58	0.08	0.59	0.15	0.51	0.20	1.92	0.18	2.14	0.53			3.25
			2.18	0.14	0.26	0.25	1.35	0.55	0.55	0.71	0.11	2.82			0.86	0.39	0.08
403	A330N	a p	1.44	0.34	0.39	0.11	0.47	0.19	0.22	0.21	0.58	0.17	2.03	0.37	0.80	0.13	1.23
404	A330T	a	0.94	0.32	0.74	0.08	0.71	0.14	0.53	0.15	0.91	0.15	1.06	0.31	0.96	0.12	1.27
405	A330P	a	0.33	0.35	0.40	0.35	1.26	0.23	0.79	0.23	0.12	0.17	0.72	0.31	5.48	0.15	0.09
			0.38	0.21	0.13	22.81	1.86	0.63	1.44	0.31	0.00	2.84			1.37	0.35	0.00
406	A330G	a p	0.91	0.31	1.27	0.11	1.14	0.16	1.34	0.12	1.32	0.19	1.54	0.37	1.01	0.15	1.16
407	I332K	a	0.15	0.29	0.47	0.11	0.59	0.13	0.60	0.15	0.40	0.13	1.52	0.34	0.90	0.17	0.68
408	I332R	a	0.14	0.33	0.39	0.07	0.58	0.16	0.37	0.17	0.27	0.14	1.25	0.33	0.79</		

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		IIIa:IIb	
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf		
417	L234K	a	0.43	0.34	0.65	0.50	1.42	0.32	1.09	0.12	0.53	0.75	2.02	0.07	0.62	0.14	0.38	
418	L234R	a	0.38	0.36	0.87	0.57	1.49	0.37	1.52	0.19	0.73	0.59	1.72	0.10	1.19	0.12	0.49	
419	L234S	a	0.49	0.20	1.01	0.41	1.40	0.26	1.30	0.14	0.69	0.32	1.10	9.38	0.93	0.10	0.49	
420	L234A	a	0.44	0.09	0.80	0.30	0.85	0.19	0.62	0.09	0.35	0.24	0.88	0.04	0.58	0.10	0.41	
421	L234M	a	0.64	0.08	0.89	0.24	0.90	0.17	0.65	0.10	0.49	0.16	0.88	0.26	0.55	0.10	0.54	
422	L234W	a																
423	L234P	a																
424	L234G	a	0.70	0.47	3.26	0.53	3.62	0.34	3.48	0.26	2.17	0.61	1.91	0.08	2.54	0.11	0.60	
			0.08	0.20			0.62	0.68	0.69	26.67	0.01	2.83			1.75	0.37	0.02	
425	L235E	a	0.34	0.28	0.63	0.31	0.83	0.19	0.80	0.08	1.06	0.18	0.93	0.04	0.78	0.14	1.28	
426	L235K	a	0.42	0.64	0.56	0.55	1.28	0.35	1.34	0.13	0.63	0.71	1.55	0.13	0.96	0.17	0.49	
427	L235R	a	0.35	0.69	0.71	0.52	1.93	0.29	1.15	0.11	0.62	0.68	1.73	0.07	0.53	0.17	0.32	
428	L235A	a	0.34	0.22	0.62	0.35	0.84	0.21	0.78	0.10	0.41	0.30	1.00	0.04	0.97	0.15	0.49	
429	L235M	a	0.38	0.09	0.79	0.26	0.89	0.19	0.64	0.09	0.46	0.23	1.05	0.05	0.69	0.11	0.51	
430	L235W	a	0.11	0.34	0.90	0.19	0.77	0.17	0.50	0.08	0.32	0.24	0.83	0.04	0.46	0.11	0.42	
431	L235P	a	0.13	0.62	1.16	0.27	1.16	0.18	0.89	0.10	0.78	0.23	1.31	0.05	0.86	0.12	0.67	
432	L235G	a			579	0.99	0.31	1.02	0.19	0.74	0.11	0.43	0.34	1.12	0.06	0.68	0.11	0.42
433	V264D	a	0.56	0.20	0.19	0.22	0.24	0.49	0.54	0.38	0.93	0.69	0.54	0.67	7.67	0.51	3.92	
434	V264E	a	0.67	0.06	0.37	0.44	0.74	0.26	0.94	0.09	0.44	0.67	0.60	0.07	0.93	0.17	0.60	
435	V264N	a	0.93	0.15	1.04	0.17	1.63	0.28	1.60	0.25	0.34	0.69			3.39	0.56	0.21	
436	V264Q	a	0.62	0.08	0.48	0.25	0.68	0.20	0.61	0.09	0.38	0.20	0.73	0.13	0.72	0.14	0.55	
437	V264K	a	0.48	0.13	0.46	0.39	0.77	0.24	0.67	0.09	0.36	0.45	0.97	0.05	0.50	0.11	0.47	
438	V264R	a	0.31	1.12	1.21	0.66	2.37	0.30	2.01	0.13	7.42	11.18	3.05	0.04	0.67	0.10	3.13	
439	V264S	a	1.15	0.23	0.69	0.17	1.37	0.51	0.81	0.37	0.35	0.69	0.83	0.72	5.13	0.52	0.26	
440	V264H	a	0.34	0.09	0.27	0.25	0.30	0.20	0.22	0.13	0.16	0.22	0.58	0.05	0.55	0.18	0.52	
441	V264W	a	0.59	0.06	0.81	0.27	0.81	0.18	0.67	0.09	0.39	0.27	0.86	0.03	0.87	0.15	0.48	
442	V264P	a																
443	V264G	a	0.41	0.19	0.26	0.19	1.11	0.26	1.14	0.33	0.21	0.70	1.13	0.53	0.93	0.57	0.19	
444	D265Q	a	0.33	0.23	0.94	0.30	0.89	0.19	0.71	0.11	0.51	0.45	1.04	0.13	0.76	0.14	0.57	
445	D265K	a	0.20	1.32	1.72	0.42	2.15	0.23	1.46	0.13	1.00	1.01	2.12	0.05	0.87	0.19	0.47	
446	D265R	a	0.71	1.23	0.77	0.79	2.55	0.45	2.18	0.14	1.50	1.54	2.98	0.04	1.16	0.13	0.59	
447	D265S	a	0.29	0.47	0.50	0.44	1.07	0.27	0.89	0.10	0.49	0.65	1.47	0.07	0.53	0.11	0.46	
448	D265T	a	0.41	0.39	0.64	0.46	1.41	0.26	1.04	0.12	0.61	0.67	1.66	0.07	0.74	0.13	0.43	
449	D265H	a	0.33	0.23	0.48	0.53	0.86	0.23	0.74	0.09	0.40	0.52	1.24	0.04	0.72	0.10	0.47	
450	D265V	a	0.11	0.76	0.72	0.38	0.93	0.22	0.92	0.11	0.47	0.60	1.39	0.06	0.44	0.11	0.50	
451	D265L	a	0.14	0.58	0.86	0.34	0.90	0.19	0.78	0.10	0.53	0.52	0.92	0.04	0.55	0.11	0.59	
452	D265I	a	0.24	1.08	1.70	0.36	1.63	0.20	1.44	0.11	0.90	0.65	1.60	0.06	0.49	0.12	0.55	
453	D265F	a	0.12	0.67	1.00	0.32	0.98	0.19	0.88	0.11	0.67	0.75	0.97	0.04	0.55	0.09	0.68	
454	D265M	a	0.49	0.28	0.56	0.34	0.80	0.18	0.74	0.09	0.59	0.32	0.63	0.08	0.61	0.13	0.74	
455	D265Y	a	0.01	1.21		13.21	0.58	0.40	0.30	1.04	0.02	1.09			0.43	0.46	0.03	
456	D265W	a	0.52	0.43	0.72	0.34	0.99	0.17	0.98	0.09	0.84	0.42	1.02	0.09	0.67	0.13	0.85	
457	D265P	a	0.74	0.43	1.13	0.41	1.94	0.20	1.56	0.10	1.19	0.56	1.92	0.10	1.18	0.12	0.61	
458	K326P	a																
459	A327E	a	0.99	0.11	0.71	0.17	0.54	0.12	0.45	0.07	0.64	0.20	0.59	0.08	0.91	0.15	1.18	
460	A327K	a	0.93	0.17	1.19	0.29	1.25	0.15	0.96	0.09	1.01	0.46	1.21	0.10	1.01	0.14	0.81	
461	A327R	a p	0.91	0.17	1.20	0.27	1.36	0.15	0.95	0.10	0.98	0.51	1.29	0.10	0.80	0.12	0.72	
462	A327H	a p	1.36	0.14	0.52	0.47	1.01	0.23	0.97	0.13	0.75	0.54	1.39	0.11	1.29	0.15	0.74	
463	A327V	a																
464	A327I	a	0.65	0.07	0.26	0.26	0.44	0.21	0.33	0.11	0.27	0.25	0.56	0.09			0.60	
465	A327F	a	0.69	0.07	0.45	0.27	0.64	0.17	0.51	0.09	0.37	0.27	0.60	0.08	0.71	0.20	0.58	
466	A327M	a	0.82	0.07	0.64	0.26	0.78	0.16	0.67	0.09	0.51	0.24	0.75	0.08	1.08	0.14	0.66	
467	A327Y	a	1.04	0.09	0.70	0.31	0.86	0.18	0.76	0.10	0.61	0.30	0.86	0.08	1.23	0.13	0.71	
468	A327W	a	0.76	0.09	0.66	0.25	0.70	0.14	0.59	0.08	0.47	0.28	0.68	0.08	0.90	0.12	0.67	
469	A327P	a	1.06	0.09	0.78	0.23	0.76	0.13	0.63	0.08	0.47	0.22	0.80	0.07	0.86	0.14	0.61	
470	L328D	a	0.95	0.15	0.64	0.19	0.54	0.12	0.51	0.09	0.51	0.31	0.43	0.09	0.89	0.15	0.95	
471	L328Q	a p	1.15	0.07	0.70	0.22	0.86	0.14	0.77	0.07	0.67	0.22	0.79	0.10	0.89	0.16	0.78	
472	L328K	a	0.77	0.22	0.51	0.38	0.99	0.20	0.91	0.09	0.87	0.32	1.13	0.09	0.95	0.19	0.88	
473	L328R	a	0.07	0.27	0.10	0.82	0.88	0.58	0.37	1.05	0.11	0.93	1.21	0.52	1.82	0.46	0.12	
474	L328S	a	0.96	0.08	1.14	0.17	0.90	0.13	0.70	0.07	0.59	0.19	0.76	0.08	0.66	0.20	0.65	
475	L328T	a	0.60	0.07	0.62	0.23	0.61	0.12	0.44	0.07	0.46	0.24	0.59	0.08	0.74	0.14	0.76	
476	L328V	a	0.70	0.06	0.54	0.18	0.60	0.13	0.43	0.08	0.49	0.22	0.57	0.09	0.52	0.12	0.82	
477	L328I	a	0.79	0.08	0.69	0.19	0.67	0.12	0.55	0.07	0.58	0.20	0.60	0.08	0.77	0.14	0.86	
478	L328Y	a	1.05	0.09	0.88	0.19	0.75	0.12	0.63	0.08	0.47	0.30	0.71	0.07	0.92	0.13	0.63	
479	L328W	a	1.01	0.06	1.16	0.19	0.90	0.13	0.82	0.09	0.73	0.30	0.63	0.09	1.35	0.13	0.81	
480	L328P	a	0.72	0.07	0.38	0.29	0.61	0.17	0.52	0.08	0.42	0.33	0.56	0.09	0.76	0.19	0.68	
481	L328G	a	1.18	0.10	0.71	0.34	0.90	0.16	0.93	0.08	0.64	0.41	0.80	0.08	1.16	0.24	0.70	
482	P329D	a	0.72	0.12	0.55	0.32	0.82	0.17	0.80	0.09	0.62	0.29	0.80	0.09	0.79	0.26	0.76	
483	P329E	a																
484	P329N	a	0.76	0.08	0.65	0.54	0.98	0.15	0.86	0.08	0.97	0.21	0.97	0.08	1.00	0.13	0.99	
485	P329Q	a	0.72	0.15	0.70	0.33	0.84	0.17	0.81	0.09	0.68	0.41	0.91	0.08			0.80	
486	P329K	a	0.20	2.88			0.16	0.47	0.57	0.42	0.02	0.90	1.17	0.53	0.72	0.12	0.10	
487	P329R	a	1.83	0.18	2.06	0.33	2.38	0.17	2.03	0.10	1.52	0.43	2.23	0.07	1.64	0.16	0.64	
488	P329S	a	0.60	0.13	0.77	0.25	0.76	0.14	0.75	0.52	0.62	0.36	0.87	0.07	0.77	0.13	0.82	

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:I Ib
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
489	P329T	a	0.34	0.11	0.49	0.21	0.47	0.14	0.33	0.10	0.41	0.32	0.52	0.09	0.70	0.13	0.88
490	P329H	a	0.09	0.21	0.24	0.57	0.24	0.15	0.30	0.23	0.03	0.25	1.05	0.12	0.64	0.41	0.12
491	P329V	a	0.51	0.19	0.33	0.49	0.31	0.21	0.28	0.26	0.04	0.27	1.62	0.12	0.64	0.39	0.12
492	P329L	a	0.17	0.21	0.24	0.58	0.22	0.13	0.22	0.17	0.04	0.19	2.78	0.16	0.56	0.42	0.18
493	P329I	a	0.40	0.15	0.31	0.54	0.27	0.21	0.27	0.21	0.03	0.18	2.57	0.14	0.48	0.36	0.12
494	P329M	a	0.21	0.16	0.23	0.57	0.21	0.21	0.16	0.18	0.03	0.21	4.36	0.15	0.62	0.43	0.13
495	P329Y	a															
496	P329W	a	0.54	0.55			0.09	1.39	0.61	0.76	0.02	1.47	1.04	0.49	3.16	0.72	0.25
497	P329G	a	1.03	0.14	0.30	0.47	0.25	0.16	0.29	0.14	0.06	0.19	4.72	0.13	0.45	0.40	0.23
498	P331D	ap	3.14	0.18	0.92	0.49	1.18	0.12	1.23	0.19	0.74	0.18	5.89	0.12	0.79	0.40	0.63
			1.65	0.12	0.32	0.19	1.00	0.50	0.86	4.39	0.05	2.82			0.80	0.42	0.05
499	P331Q	a	1.71	0.14	0.60	0.40	0.63	0.13	0.77	0.17	0.64	0.12	2.46	0.12	0.60	0.46	1.01
500	P331R	a	2.29	0.19	0.39	0.42	0.54	0.22	0.32	0.22	0.29	0.09	0.96	0.15	0.89	0.37	0.54
501	P331T	a	1.67	0.13	0.53	0.41	0.71	0.17	0.88	0.23	0.57	0.10	3.25	0.14	0.57	0.37	0.81
502	P331L	ap	1.95	0.33	0.53	0.45	0.92	0.12	0.99	0.24	0.50	0.12	6.07	0.15	0.54	0.40	0.54
			0.64	0.16	0.68	0.14	1.14	0.11	1.37	0.36	0.35	0.36	5.28	0.12	1.77	0.13	0.31
503	P331I	a	1.63	0.15	0.41	0.41	0.71	0.18	0.78	0.19	0.22	0.19	3.81	0.16	0.56	0.41	0.32
504	P331F	a	1.02	0.13	0.51	0.18	0.67	0.41	0.97	0.26	0.29	0.69	0.96	0.48	3.91	0.90	0.44
505	P331M	a	1.74	0.12	0.60	0.47	1.13	0.18	0.94	0.16	0.77	0.12	2.50	0.12	0.53	0.37	0.68
506	P331Y	a	1.20	0.13	1.24	0.16	0.47	0.47	0.82	0.35	0.69	0.69	0.95	0.55	6.06	0.75	1.47
507	P331W	a	1.95	0.13	0.79	0.41	1.46	0.14	1.32	0.18	0.76	0.12	2.41	0.13	0.87	0.46	0.52
508	E333L	a	1.03	0.14	0.56	0.44	0.93	0.15	0.94	0.23	0.90	0.10	3.06	0.16	1.03	0.49	0.97
509	E333F	ap	2.22	0.14	0.69	0.45	0.93	0.18	1.55	0.30	1.69	0.15	6.96	0.16	0.82	0.42	1.82
			0.91	0.17	0.86	0.14	1.58	0.18	1.66	0.39	1.22	0.40	5.83	0.20	1.96	0.15	0.77
510	E333M	a	1.17	0.18	0.86	0.15	1.20	1.87	0.21	0.76	0.74	0.70	0.96	0.53	5.46	0.78	0.62
511	E333P	a															
512	K334P	a															
513	K222E	a	1.77	0.13	1.26	0.41	1.04	0.16	1.22	0.20	1.51	0.14	1.23	0.15	0.64	0.38	1.44
514	K222Y	a	0.77	0.14	0.48	0.51	0.50	0.15	0.34	0.26	0.34	0.10	1.06	0.12	0.66	0.41	0.68
			1.92	0.22	1.28	0.28	1.69	0.42	1.33	0.44	0.11	2.86			1.31	0.39	0.07
515	F243E	a	0.93	0.13	0.18	0.33	1.24	0.49	0.63	0.52	0.14	2.84			1.14	0.40	0.11
516	D270R	a	0.60	0.32	0.37	0.56	0.94	0.12	0.36	0.19	0.14	0.13	0.47	0.16	0.82	0.43	0.14
517	D270S	a	0.81	0.16	0.69	0.44	1.80	0.14	0.61	0.18	0.19	0.13	0.81	0.19	1.03	0.49	0.10
518	D270L	a	1.03	0.18	0.59	0.47	0.35	0.19	0.31	0.16	0.40	0.11	0.72	0.12	0.54	0.43	1.15
519	D270I	a	0.58	0.15	0.15	0.30	0.76	0.60			0.02	2.83			1.23	0.38	0.03
520	D270F	a	0.66	0.18	0.64	0.40	0.39	0.17	0.21	0.15	0.19	0.14	0.70	0.13	0.70	0.40	0.49
521	D270M	a	0.74	0.19	0.43	0.49	0.21	0.18	0.37	0.19	0.36	0.09	1.11	0.12	0.99	0.44	1.72
522	D270Y	a	0.51	0.22	0.54	0.48	0.34	0.14	0.37	0.16	0.28	0.11	0.62	0.18	0.93	0.37	0.83
523	D270W	a	0.84	0.20	0.49	0.44	0.25	0.20	0.38	0.21	0.17	0.10	0.62	0.21	0.92	0.43	0.68
524	D270P	a	0.37	0.21	0.32	0.60	0.25	0.19	0.32	0.22	0.04	0.23	0.91	0.27	0.55	0.34	0.15
525	D270G	a	0.52	0.24	0.42	0.50	0.38	0.12	0.22	0.23	0.08	0.18	0.63	0.30	0.97	0.46	0.21
526	P271D	ap	1.48	0.15	0.77	0.43	1.20	0.13	1.02	0.14	1.12	0.13	1.80	0.14	0.52	0.42	0.93
527	P271E	a	1.87	0.14	0.65	0.46	0.95	0.15	0.72	0.17	0.75	0.17	0.72	0.14	0.41	0.50	0.79
528	P271N	a	1.61	0.13	0.78	0.41	0.98	0.11	0.79	0.12	0.63	0.14	1.17	0.13	0.54	0.41	0.64
529	P271Q	a	0.55	0.24	0.71	0.09	1.07	0.79	0.66	0.30	0.60	0.23	0.86	0.18	0.56	0.12	0.56
530	P271K	a	0.63	0.27	0.67	0.09	0.90	0.87	0.36	0.29	0.71	0.17	0.71	0.20	0.87	0.16	0.79
531	P271R	a	0.60	0.30	0.67	0.08	1.68	1.14	0.28	0.31	0.51	0.19	0.52	0.20	0.78	0.14	0.31
532	P271S	a	0.55	0.24	0.73	0.08	1.71	1.10	0.61	0.27	0.70	0.21	0.71	0.16	1.14	0.14	0.41
533	P271T	a	0.77	0.22	0.97	0.07	2.73	0.90	0.83	0.30	0.53	0.19	0.95	0.17	3.88	0.12	0.19
534	P271H	a	0.56	0.30	0.63	0.13	0.37	0.66	0.45	0.31	0.67	0.20	0.88	0.18	0.74	0.13	1.80
535	P271A	ap	0.85	0.24	0.70	0.07	1.05	0.87	0.93	0.27	0.73	0.23	1.02	0.17	1.01	0.21	0.70
536	P271V	a	0.33	0.30	0.43	0.14	1.73	0.95	0.15	0.33	0.17	0.18	0.50	0.18	0.54	0.16	0.10
			1.52	0.15	0.35	0.27	0.84	0.43	0.75	0.42	0.06	2.82			1.06	0.38	0.07
537	P271L	a	1.77	0.27	0.73	0.09	1.09	0.79	1.17	0.30	0.46	0.22	1.56	0.16	0.43	0.23	0.42
538	P271I	ap	0.99	0.22	2.13	0.08	1.42	0.71	1.09	0.27	1.28	0.19	1.51	0.16	1.99	0.20	0.90
539	P271F	a	0.64	0.25	0.54	0.12	1.66	0.92	0.45	0.29	0.44	0.20	0.89	0.19	0.68	0.12	0.26
540	P271M	a	0.91	0.30	0.62	0.08	2.37	1.38	0.67	0.28	0.52	0.20	0.91	0.20	0.54	0.14	0.22
541	P271Y	a	0.71	0.31	0.70	0.12	3.65	1.10	0.21	0.36	0.37	0.21	0.64	0.17	1.48	0.14	0.10
542	P271W	a	0.60	0.24	0.63	0.47	0.52	0.73	0.25	0.32	0.72	0.22	1.06	0.18	0.98	0.15	1.37
543	P271G	a	0.88	0.21	2.33	0.04	1.79	0.86	5.03	0.27	1.09	0.27	0.96	0.17	0.57	0.22	0.61
			2.07	0.14	1.50	0.25	4.50	0.37	4.02	0.34	0.07	2.82			0.79	0.37	0.02
544	D280K	a	1.99	0.32	0.68	0.08	1.54	0.83	0.51	0.32	0.59	0.17	0.68	0.20	0.38	0.17	0.38
545	D280L	a	0.62	0.25	0.84	0.06	1.33	0.78	0.39	0.29	0.65	0.29	0.86	0.19	0.45	0.16	0.49
546	D280W	a	0.47	0.26	0.83	0.07	1.30	0.78	0.33	0.30	0.57	0.24	0.76	0.18	0.38	0.16	0.44
547	D280P	a	0.81	0.12			0.91	0.34			0.28	0.17					0.31
548	D280G	a	1.75	0.15	0.92	0.25	2.12	0.63	1.71	0.31	0.15	2.82			0.98	0.38	0.07
549	K290D	a	0.91	0.31	1.42	0.07	1.36	1.07	1.87	0.28	1.81	0.23	2.20	0.20	0.33	0.15	1.33
550	K290N	a	0.85	0.30	1.26	0.07	0.76	0.90	1.31	0.28	1.48	0.21	1.97	0.17	0.39	0.14	1.93
551	K290H	a	1.14	0.34	1.13	0.06	1.66	0.86	0.83	0.30	1.50	0.23	1.88	0.19	0.41	0.16	0.90
552	K290L	a	1.07	0.10			0.86	0.29			0.30	0.18					0.35
553	K290W	a	0.76	0.19	1.00	0.15	0.38	0.66	1.44	0.29	1.37	0.28	1.53	0.19	0.68	0.13	3.63
554	E293N	a	1.24	0.25	0.83	0.08	1.43	0.91	0.62	0.30	0.67	0.18	1.06	0.21	0.71	0.24	0.47

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIf
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
555	E293R	a p	172	0.64	0.66	0.20	1.75	0.82	0.40	0.46	68.81	2.94	3.16	0.48	0.67	0.15	39.28
			18.03	0.43	0.93	0.16	2.22	0.28	0.88	0.31	2.90	1.26	1.77	0.36	0.38	0.31	1.31
556	E293S	a	2.69	0.25	0.91	0.17	1.61	0.76	0.57	0.34	0.86	0.22	1.01	0.21	0.53	0.20	0.53
557	E293T	a	1.50	0.38	0.73	0.09	2.11	0.91	0.55	0.27	0.69	0.21	0.91	0.24	0.58	0.15	0.33
558	E293H	a	2.26	0.21	0.59	0.09	1.85	1.06	0.29	0.26	0.61	0.18	1.05	0.28	0.48	0.13	0.33
559	E293V	a	2.23	0.30	0.77	0.13	4.03	0.97	0.55	0.28	0.90	0.19	1.08	0.22	0.63	0.14	0.22
560	E293L	a	1.66	0.28	0.85	0.14	2.79	0.83	0.56	0.30	0.51	0.18	1.02	0.26	0.77	0.15	0.18
561	E293I	a	1.28	0.22	0.79	0.16	0.47	0.68	0.33	0.29	0.61	0.19	0.77	0.23	0.60	0.13	1.29
562	E293F	a	0.74	0.13	0.51	0.09	1.27	0.95	0.31	0.31	0.23	0.25	0.64	0.12	0.61	0.20	0.18
563	E293M	a	1.30	0.21	1.06	0.09	0.60	0.95	1.01	0.29	0.39	0.26	0.53	0.14	0.90	0.21	0.65
564	E293Y	a	0.84	0.14	0.59	0.13	0.91	1.15	0.28	0.33	0.24	0.24	0.61	0.13	0.66	0.20	0.26
565	E293W	a	0.92	0.21	0.68	0.12	4.93	1.73	0.21	0.56	0.24	0.23	0.45	0.14	0.65	0.23	0.05
566	E293P	a	0.34	0.28	0.26	0.14	9.25	1.72	0.10	0.31	0.10	0.23	0.66	0.14	0.44	0.17	0.01
567	E293G	a	1.25	0.26	0.68	0.09	1.00	1.38	0.24	0.31	0.31	0.25	0.77	0.13	0.59	0.18	0.31
568	E294K	a	0.70	0.29	0.57	0.13	1.44	1.19	0.45	0.34	1.02	0.25	0.50	0.14	0.74	0.23	0.71
			0.68	0.19	0.36	0.27	1.57	0.64	0.61	0.81	0.07	2.82			1.16	0.40	0.04
569	E294R	a	0.71	0.10	0.60	0.14	0.98	0.98	0.65	0.22	0.86	0.25	0.58	0.13	0.92	0.28	0.89
570	E294S	a	0.87	0.11			0.84	0.72			0.30	0.18					0.36
571	E294T	a	1.28	0.11	1.37	0.10	0.68	0.98	1.16	0.26	0.45	0.25	1.07	0.15	0.71	0.33	0.66
572	E294H	a	1.50	0.27	1.11	0.13	0.58	0.92	0.55	0.22	0.45	0.27	0.81	0.12	0.76	0.20	0.77
573	E294V	a	0.86	0.21	0.74	0.10	0.39	1.28	0.87	0.22	0.43	0.49	0.87	0.13	0.70	0.17	1.11
574	E294L	a	0.43	0.26	0.35	0.15	0.42	1.14	0.45	0.24	0.35	0.58	0.93	0.12	0.45	0.19	0.83
			1.23	0.26	0.70	0.32	1.30	0.20	1.26	0.30	1.65	0.16			0.98	0.47	1.26
575	E294I	a	1.70	0.25	0.95	0.14	3.65	1.09	0.83	0.26	0.71	0.23	1.05	0.13	1.09	0.22	0.19
576	E294F	a	1.08	0.35	0.89	0.16	0.56	0.95	0.58	0.22	0.43	0.31	0.72	0.16	0.90	0.18	0.78
577	E294M	a	0.96	0.15	0.84	0.09	1.70	1.26	0.65	0.27	0.67	0.28	1.17	0.14	0.78	0.21	0.39
578	E294Y	a	0.70	0.12			0.68	0.49			1.32	0.17					1.95
579	E294W	a	0.74	0.18	0.93	0.10	0.99	1.08	0.77	0.22	1.70	0.38	1.37	0.15	0.80	0.20	1.73
580	E294P	a	1.00	0.20	1.09	0.12	1.34	0.97	0.50	0.23	0.67	0.24	0.50	0.12	0.77	0.26	0.50
581	E294G	a	1.55	0.20	1.18	0.09	0.55	0.97	1.45	0.21	0.61	0.25	0.94	0.14	1.25	0.27	1.10
582	Q295D	a	1.73	0.24	0.57	0.10	3.31	1.54	0.67	0.30	0.54	0.26	2.41	0.27	0.55	0.17	0.16
583	Q295E	a	4.42	0.12	1.49	0.14	1.91	1.40	0.88	0.22	1.03	0.24	0.84	0.17	0.96	0.23	0.54
			1.36	0.26	1.37	0.26	0.80	0.27	0.72	0.20	0.89	0.15			0.81	0.49	1.10
584	Q295N	a	2.09	0.18	0.81	0.12	5.76	1.58	0.50	0.34	0.45	0.25	0.69	0.15	0.93	0.17	0.08
585	Q295R	a	1.30	0.19	0.78	0.11	0.51	0.87	0.45	0.30	0.35	0.28	1.43	0.22	0.67	0.16	0.69
586	Q295S	a	1.27	0.12	0.74	0.13	0.95	1.07	0.77	0.31	0.55	0.24	1.89	0.13	0.72	0.23	0.57
587	Q295T	a	1.46	0.12	1.84	0.11	1.09	1.04	1.54	0.23	1.36	0.24	1.48	0.21	3.82	0.20	1.25
588	Q295H	a	1.14	0.20	1.01	0.11	4.39	1.62	0.79	0.31	0.43	0.25	1.39	0.20	0.76	0.32	0.10
589	Q295V	a	2.12	0.19	1.63	0.10	0.99	1.15	1.56	0.24	0.61	0.25	1.35	0.18	1.19	0.20	0.62
590	Q295I	a	1.42	0.17	1.99	0.12	1.94	1.00	1.04	0.21	0.53	0.27	1.28	0.15	0.68	0.37	0.27
591	Q295F	a	1.38	0.27	0.87	0.13	1.79	1.17	0.28	0.28	0.33	0.26	1.73	0.12	0.83	0.24	0.19
592	Q295M	a	2.88	0.26	1.69	0.11	1.50	1.00	0.66	0.40	0.81	0.27	2.93	0.17	0.70	0.25	0.54
593	Q295Y	a	0.94	0.22	0.61	0.11	0.18	0.86	0.56	0.22	0.27	0.29	2.30	0.14	0.62	0.34	1.47
594	Q295W	a	0.12	0.24	0.43	0.48	0.38	0.42	0.50	0.33	0.27	0.24	3.15	0.16	0.32	0.38	0.71
595	Q295P	a	0.38	0.30	0.94	0.28	0.57	0.37	0.71	0.20	0.48	0.32	3.14	0.14	0.49	0.36	0.83
596	Q295G	a	0.19	0.23	0.62	0.35	0.35	0.51	0.47	0.25	0.54	0.25	4.08	0.12	0.35	0.37	1.54
597	Y296K	a	0.21	0.26	0.40	0.36	0.33	0.53	0.54	0.30	0.35	0.16	2.67	0.14	0.58	0.34	1.07
598	Y296R	a	0.26	0.41	0.58	0.28	0.41	0.48	0.74	0.20	0.54	0.15	2.51	0.13	0.49	0.34	1.33
599	Y296A	a	0.56	0.35	0.44	0.27	0.48	0.39	0.68	0.33	1.06	0.23	4.09	0.14	0.42	0.40	2.20
600	Y296V	a	0.41	0.29	1.08	0.51	0.58	0.31	0.88	0.14	0.72	0.26	6.49	0.13	0.48	0.41	1.25
601	Y296M	a	0.21	0.33	0.94	0.36	0.64	0.34	0.90	0.17	0.65	0.28	3.02	0.13	0.53	0.36	1.01
602	Y296G	a	0.63	0.82	1.65	0.42	0.58	0.32	1.01	0.21	0.33	0.27	5.51	0.19	0.59	0.38	0.56
603	S324H	a p	0.99	0.33	0.84	0.25	0.74	0.29	0.57	0.17	0.73	0.36	3.54	0.13	0.57	0.34	0.98
604	S324F	a	1.17	0.40	0.94	0.29	0.65	0.33	0.74	0.23	0.92	0.30	4.10	0.15	0.50	0.33	1.43
605	S324M	a	0.76	0.80	1.13	0.28	0.88	0.23	1.07	0.12	1.46	0.24	2.02	0.13	0.61	0.33	1.66
606	S324W	a															
607	S324P	a	0.28	0.30	0.42	0.29	1.23	0.26	1.01	0.15	1.38	0.29	1.68	0.14	0.63	0.34	1.12
608	S324G	a	1.61	0.33	2.07	0.27	1.92	0.27	1.89	0.34	6.18	0.22	3.22	0.16	1.70	0.36	3.22
			0.60	0.15	3.06	0.11	2.56	0.18	2.18	0.30	3.93	0.30	2.14	0.13	2.74	0.18	1.53
			1.46	0.20	1.55	0.23	1.07	0.20	0.89	0.27	1.88	0.10			1.25	0.50	1.77
609	P230E	a	2.07	0.52	1.25	0.31	2.34	0.45	1.47	0.15	1.40	0.24	2.70	0.13	1.01	0.34	0.60
610	P230Y	a	0.44	0.52	0.40	0.30	0.85	0.34	1.22	0.20	0.56	0.33	2.00	0.12	0.65	0.33	0.66
611	P230G	a	1.04	0.45	0.99	0.38	1.13	0.36	0.75	0.21	0.48	0.22	1.27	0.16	1.16	0.34	0.42
612	A231E	a															
613	A231K	a	0.50	0.36	0.62	0.34	0.41	0.61	0.58	0.24	0.58	0.49	1.40	0.16	0.52	0.33	1.39
614	A231Y	a															
615	A231P	a	1.17	0.15			0.81	0.43			0.31	0.17					0.38
616	A231G	a															
617	E233N	a	0.16	0.28	0.50	0.44	0.34	0.79	0.46	0							

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		IIIa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
622	E233T	a	0.15	0.35	1.28	0.39	0.78	0.40	0.83	0.13	0.42	0.19	0.99	0.17	1.19	0.35	0.54
623	E233H	a	0.17	0.32	0.74	0.27	0.58	0.40	0.78	0.14	0.32	0.27	1.05	0.15	0.99	0.33	0.55
624	E233A	a	0.10	0.31	1.23	0.33	0.60	0.44	0.71	0.20	0.46	0.21	1.02	0.13	0.93	0.38	0.75
625	E233V	a	0.25	0.48	0.71	0.31	0.37	0.61	0.61	0.17	0.50	0.21	0.70	0.15	0.91	0.33	1.34
626	E233L	a	0.53	0.40	0.55	0.29	0.26	0.53	0.54	0.27	0.52	0.19	2.24	0.17	0.60	0.34	1.99
627	E233I	ap	0.30	0.28	1.09	0.29	1.69	0.27	1.80	0.14	0.88	0.27	2.30	0.14	0.95	0.34	0.52
628	E233F	a	0.23	0.34	0.64	0.31	0.73	0.38	0.84	0.27	0.58	0.20	1.27	0.15	0.90	0.35	0.79
629	E233M	a	0.29	0.27	0.67	0.27	0.49	0.48	0.85	0.15	0.70	0.18	1.56	0.14	1.13	0.43	1.42
630	E233Y	a	0.31	0.14	0.96	0.10	0.97	0.16	0.55	0.14	0.37	0.09	0.70	0.410	1.86	0.27	0.38
631	E233W	a	0.28	0.17	0.86	0.12	0.82	0.14	0.70	0.15	0.35	0.13	0.91	0.34	1.64	0.24	0.43
632	E233G	a	0.36	0.14	1.21	0.11	0.94	0.22	0.74	0.13	1.21	0.10	1.03	0.29	2.09	0.25	1.29
633	E272D	a	1.26	0.24	1.25	0.10	1.12	0.13	1.41	0.12	1.49	0.16	1.48	0.18	1.37	0.22	1.33
634	E272R	ap	66.62	0.43	0.84	0.11	0.80	0.17	1.91	0.27	41.60	2.06	26.26	1.83	0.22	51.94	
			98.41	0.98	0.94	0.21	1.26	0.31	0.47	0.30	0.67	0.35		2.58	1.62	0.25	0.53
635	E272T	a	3.32	0.22	1.24	0.11	1.74	0.31	1.34	0.18	3.04	0.25	0.69	0.23	2.46	0.21	1.75
			0.96	0.23	0.44	0.26	0.75	0.23	0.74	0.17	0.31	0.17			0.79	0.48	0.41
636	E272H	ap	7.21	0.20	0.84	0.09	1.92	0.10	0.83	0.13	28.57	0.15	0.55	0.20	1.45	0.27	14.86
			4.09	0.51	0.88	0.15	1.70	0.15	1.18	0.26	9.83	0.37	1.42	0.25	0.90	0.23	5.77
			1.02	0.26	0.49	0.29	0.43	0.39	0.26	0.47	0.35	0.10			0.92	0.43	0.80
637	E272V	a	2.80	0.28	0.96	0.10	0.72	0.13	0.50	0.17	1.19	0.23	0.67	0.20	1.77	0.25	1.64
638	E272L	a	2.07	0.22	1.10	0.10	0.83	0.13	0.62	0.13	1.07	0.19	0.75	0.21	1.81	0.21	1.29
639	E272F	a															
640	E272M	a															
641	E272W	a	1.61	0.32	1.06	0.11	1.09	0.12	0.68	0.15	2.59	0.15	0.62	0.23	1.82	0.23	2.38
642	E272P	a	5.27	0.21	1.14	0.14	2.99	0.14	3.36	0.22	0.67	0.11	0.55	0.30	2.17	0.21	0.23
			1.73	0.23	0.37	0.30	3.46	0.17	4.31	0.13	0.32	0.11			0.67	0.62	0.09
643	E272G	a	1.25	0.11			0.46	0.45			0.24	0.18					0.52
644	K274D	a															
645	K274N	a	1.25	0.17	1.37	0.10	1.17	0.13	1.42	0.13	1.18	0.09	1.55	0.21	1.26	0.25	1.01
647	K274H	a	1.02	0.22			1.21	0.30			0.27	0.24					0.22
648	K274V	a															
649	K274I	a	1.83	0.16	1.42	0.08	1.51	0.14	2.20	0.13	1.47	0.16	2.03	0.19	1.08	0.28	0.98
650	K274F	a	1.98	0.15	1.22	0.09	1.04	0.14	1.89	0.16	1.25	0.09	3.52	0.18	1.02	0.22	1.20
651	K274M	a	1.42	0.14	1.65	0.09	1.28	0.10	1.18	0.12	1.42	0.08	1.89	0.21	1.01	0.22	1.11
652	K274W	a															
653	K274P	a															
654	K274G	a	1.57	0.14	1.70	0.11	1.06	0.11	0.92	0.14	1.44	0.08	1.20	0.25	1.04	0.22	1.36
655	N276D	ap	1.54	0.13	1.34	0.13	1.21	0.11	1.04	0.11	0.88	0.05	1.10	0.26	1.18	0.21	0.72
656	N276T	a															
657	N276H	a	2.78	0.18	0.98	0.09	1.10	0.10	0.72	0.14	0.71	0.15	0.79	2.83	1.19	0.21	0.64
658	N276V	a	1.25	0.15	1.06	0.12	1.03	0.13	1.12	0.15	1.04	0.07	0.91	0.21	1.27	0.24	1.01
659	N276I	a															
660	N276F	a	1.34	0.30	1.16	0.10	1.30	0.15	1.57	0.14	1.53	0.15	2.20	0.17	1.18	0.21	1.17
661	N276M	a	1.20	0.26			0.99	0.36			0.26	0.24					0.26
662	N276W	a	2.53	0.26	1.24	0.11	1.32	0.16	2.06	0.14	1.21	0.09	1.57	0.26	2.00	0.21	0.92
663	N276P	a															
664	N276G	a															
665	Y278D	a	2.17	0.12	1.25	0.09	1.38	0.10	1.19	0.14	1.25	0.12	2.00	0.17	1.79	0.22	0.91
666	Y278N	a	1.54	0.18	0.88	0.10	0.78	0.12	0.66	0.12	0.82	0.08	0.74	9.38	1.33	0.22	1.05
667	Y278Q	ap															
668	Y278R	ap	1.98	0.25	0.92	0.12	0.62	0.11	0.58	0.15	0.54	0.10	0.82	0.25	1.23	0.22	0.87
669	Y278S	a	2.19	0.18	0.97	0.10	1.10	0.13	0.99	0.12	0.79	0.07	2.24	0.18	1.23	0.22	0.72
670	Y278H	ap															
671	Y278V	a	1.64	0.15	1.37	0.09	1.82	0.11	1.73	0.14	0.97	0.10	2.21	0.18	1.27	0.23	0.53
672	Y278L	a	2.57	0.20	1.05	0.13	1.32	0.12	0.94	0.12	2.92	0.09	0.44	0.21	1.74	0.21	2.21
673	Y278I	a	1.25	0.34	1.09	0.10	0.94	0.13	1.03	0.11	0.97	0.12	1.18	0.19	1.52	0.22	1.04
674	Y278M	a	1.49	0.16	0.94	0.09	0.71	0.10	1.02	0.15	0.55	0.15	1.22	0.20	1.28	0.21	0.77
675	Y278P	a															
676	Y278G	a															
677	K320N	a	2.63	0.13	1.33	0.10	1.45	0.11	1.42	0.12	1.64	0.11	1.89	0.18	2.01	0.22	1.13
678	K320S	a															
679	K320H	a	0.80	0.18	1.12	0.14	1.32	0.13	2.45	0.31	1.21	0.35	2.24	0.12	1.13	0.21	0.92
680	K320V	a	0.66	0.15	1.18	0.12	1.13	0.11	1.83	0.30	1.83	0.37	2.45	0.13	0.83	0.18	1.61
681	K320L	a	0.97	0.13	0.95	0.11	1.20	0.14	1.19	0.36	1.84	0.38	4.14	0.10	1.07	0.16	1.53
682	K320F	a	0.79	0.15	1.18	0.11	1.16	0.15	1.18	0.32	1.23	0.37	1.64	0.13	0.76	0.21	1.06
683	K320Y	ap	0.87	0.14	0.95	0.11	1.00	0.20	1.01	0.32	1.11	0.37	1.88	0.14	0.80	0.20	1.11
684	K320W	a	0.98	0.18	1.19	0.13	1.10	0.15	1.39	0.30	1.31	0.33	1.70	0.29	1.11	0.19	1.20
685	K320P	a															
686	K320G	a	0.73	0.20	1.11	0.12	1.06	0.14	1.19	0.37	1.21	0.36	1.53	0.12	0.69	0.22	1.13
687	K322D	a	1.11	0.15	0.80	0.12	0.78	0.10	1.43	0.31	0.80	0.36	1.69	0.11	0.48	0.25	1.03
688	K322S	a	0.93	0.43	0.94	0.11	0.97	0.11	1.99	0.31	1.14	0.36	1.86	0.11	0.87	0.20	1.17
689	K322V	a	0.69	0.14	1.07	0.11	1.25	0.14	2.00	0.31	1.16	0.39	1.51	0.11	0.72	0.18	0.92
690	K322I	a	0.69	0.28	0.90	0.11	1.33	0.15	1.54	0.32	0.92	0.36	1.61	0.11	0.75	0.24	0.69

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIf
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
691	K322F	a	0.79	0.15	0.95	0.11	1.33	0.13	1.30	0.29	0.86	0.38	1.15	0.15	0.75	0.19	0.65
692	K322Y	a p	0.77	0.14	0.95	0.11	1.11	0.17	1.18	0.37	1.03	0.34	2.10	0.11	0.87	0.22	0.93
693	K322W	a	0.65	0.17	0.87	0.13	0.73	0.18	0.77	0.35	0.95	0.32	1.48	0.11	0.66	0.18	1.31
694	K322P	a															
695	K322G	a	0.86	0.18	0.64	0.14	0.73	0.11	0.69	0.40	0.57	0.39	1.86	0.11	0.62	0.18	0.78
696	N325K	a	0.06	0.14	0.59	0.14	0.76	0.13	0.43	0.45	0.67	0.29	1.09	0.15	0.77	0.13	0.88
697	N325R	a	2.02	0.36	0.47	0.15	0.81	0.16	0.58	0.38	0.43	0.35	1.15	0.42	0.72	0.22	0.53
698	N325S	a	0.43	0.17	0.60	0.15	1.05	0.12	1.21	0.30	0.84	0.33	0.49	0.14	0.79	0.16	0.80
699	N325F	a	0.32	0.17	0.71	0.13	2.87	0.17	3.26	0.27	0.62	0.27	0.60	0.13	1.22	0.21	0.21
700	N325M	a	0.39	0.15	0.82	0.11	1.54	0.14	1.92	0.29	1.03	0.28	1.61	0.13	1.43	0.19	0.67
701	N325Y	a	0.27	0.14	0.54	0.13	0.73	0.23	0.65	0.35	0.57	0.30	1.72	0.13	0.91	0.24	0.77
702	N325W	a	0.23	0.19	0.45	0.17	0.57	0.25	0.40	0.49	0.51	0.30	1.35	0.12	0.86	0.23	0.89
703	N325P	a	0.06	0.21			0.37	2.05			0.03	0.53					0.07
704	N325G	a	0.18	0.21	0.46	0.16	0.76	0.16	0.70	0.34	0.75	0.27	0.69	0.66	0.53	0.15	0.99
705	P227E	a	1.47	0.23	1.55	0.32	1.55	0.19	1.67	0.12	2.10	0.10			1.49	0.49	1.36
706	P227K	a	0.44	0.37	0.64	0.17	0.84	0.27	3.04	0.28	0.38	0.24	0.92	0.46			0.46
			0.97	0.10	1.00	0.42	0.79	0.53	0.94	0.56	0.26	0.25	2.21	0.28	1.45	0.39	0.33
			0.92	0.20	0.85	0.29	0.89	0.22	0.77	0.22	1.03	0.13			1.16	0.51	1.16
707	P227Y	a	1.06	0.27	0.89	0.33	0.79	0.21	0.73	0.27	0.44	0.15			0.80	0.49	0.56
708	P227G	a	0.70	0.38	1.39	0.16	1.93	0.22	6.56	0.26	15.77	0.20	0.59	0.37			8.18
			1.67	0.15	0.91	0.37	1.98	0.24	3.47	0.32	12.61	0.37	1.16	0.32	1.67	0.40	6.36
709	P228E	a															
710	P228K	a	0.78	0.37	1.42	0.17	0.72	0.38	1.23	0.33	1.86	0.18	0.73	0.36			2.58
			1.91	0.28	1.31	0.58	1.14	0.25	1.13	0.54	1.28	0.25	1.62	0.29	1.55	0.39	1.12
			0.48	0.29	2.65	0.26	1.67	0.20	1.94	0.18	1.73	0.14			1.29	0.53	1.04
711	P228Y	a	0.62	0.39	1.10	0.17	0.60	0.31	2.04	0.29	0.71	0.21	1.11	0.34			1.18
			1.15	0.11	1.68	0.64	1.59	0.29	1.61	0.43	0.75	0.19	2.25	0.31	1.45	0.35	0.47
712	P228G	a	1.69	0.49	0.70	0.17	0.66	0.25	1.14	0.30	0.98	0.45	0.99	0.41			1.49
			1.00	0.19	2.60	0.68	0.96	0.24	0.54	0.54	0.98	0.18	1.89	0.42	1.77	0.37	1.01
713	G236D	a	0.42	0.57	1.31	0.16	3.39	0.21	7.15	0.54	0.19	9.45	1.08	0.38			0.05
			0.15	0.16	5.01	0.70	3.77	0.19	4.74	0.34	0.11	0.23	1.64	0.32	1.53	0.37	0.03
714	G236E	a	0.06	0.42	4.88	0.20	1.53	0.22	3.39	0.30	1.41	0.19	0.48	0.39			0.92
			0.22	0.10	3.04	0.39	1.68	0.22	2.15	0.29	1.05	0.19	1.58	0.25	1.46	0.39	0.62
			0.07	0.34	1.65	0.24	0.98	0.18	0.67	0.21	0.47	0.13			0.56	0.52	0.48
715	G236N	a	0.07	0.34	0.26	0.29	0.69	0.21	0.79	0.26	0.07	0.44			1.89	0.47	0.10
716	G236Q	a	0.03	0.44	0.83	0.14	0.49	0.72	1.28	0.34	0.21	0.39	0.99	0.35			0.43
			0.12	0.15	0.60	0.34	0.89	7.57	0.26	0.53	0.17	0.20	1.89	0.33	1.46	0.40	0.18
717	G236K	a	0.01	0.40	0.27	11.52	45.05	8.94	1.38	0.29	0.48	0.28	1.15	0.35			0.01
			0.11	0.29	3.21	4.73	0.90	3.50	0.55	0.69	0.46	0.25	2.18	0.37	1.38	0.35	0.51
			0.02	0.40					0.06	0.70	0.01	1.89			0.73	0.46	
718	G236R	a	0.01	0.38	0.29	0.23	0.63	0.33	0.62	0.69	0.20	0.72	1.04	0.34			0.32
			0.10	0.09	0.31	0.56	0.98	16.50	0.19	0.55	0.10	0.27	2.03	0.35	1.99	0.36	0.10
719	G236S	a	0.12	0.38	28.92	0.14	2.23	0.29	7.98	0.26	6.10	0.21	0.68	0.36			2.73
			0.55	0.12	22.71	0.37	2.77	0.21	3.68	0.45	5.77	0.26	1.82	0.29	1.77	0.38	2.08
720	G236T	a	0.02	0.42	1.58	0.16	0.36	0.55	1.35	0.28	0.21	0.91	0.99	0.33			0.59
			0.11	0.13	1.89	0.39	0.95	0.32	0.48	0.57	0.11	0.22	3.25	0.34	1.56	0.35	0.12
			0.06	0.36	0.56	0.26	0.34	0.47	0.15	0.35	0.04	0.85			0.43	0.58	0.10
721	G236H	a	0.05	0.47	0.69	0.20	0.36	1.36	0.46	0.39			0.87	0.36			
			0.19	0.16	2.02	0.51	0.87	15.81	0.28	0.97	0.07	0.33	2.32	0.47	1.48	0.37	0.07
			0.03	0.40	0.37	0.31	0.31	0.49	0.21	0.45	0.08	0.13			0.52	0.51	0.26
722	G236A	a	0.37	0.43	45.05	0.19	1.20	0.22	1.58	0.32	0.73	0.22	1.05	0.36			0.61
			0.48	0.16	44.99	0.28	1.05	0.24	1.45	0.50	0.65	0.18	1.64	0.27	1.75	0.35	0.62
723	G236V	a	0.03	0.52	2.06	0.15	0.23	0.88	0.96	0.36	0.24	0.37	0.99	0.37			1.02
			0.14	0.15	1.52	0.36	0.82	0.46	0.47	0.38	0.27	0.19	1.59	0.28	1.35	0.39	0.33
724	G236L	a	0.04	0.28			1.07	0.48			0.18	0.25					0.17
725	G236I	a	0.02	0.40	1.95	0.15	0.11	2.97	1.10	0.38			1.04	0.34			
			0.11	0.18	1.33	0.30	0.75	2.41	0.12	0.69	0.02	0.87	1.96	0.26	1.33	0.37	0.02
726	G236F	a	0.06	0.41	0.43	0.17	0.55	0.43	0.88	0.34	0.18	0.64	1.19	0.34			0.33
			0.21	0.23	0.44	0.54	0.92	46.70	0.08	1.29	0.05	0.76	2.56	0.48	1.75	0.36	0.06
727	G236M	a	0.03	0.38	0.29	0.19	0.43	0.37	1.22	0.42	0.21	0.44	0.67	0.34			0.49
			0.14	0.12	0.34	0.44	0.79	0.83	0.40	0.67	0.19	0.20	1.40	0.55	1.60	0.35	0.24
728	G236Y	a	0.04	0.39	0.83	0.16	0.44	1.15	0.91	0.44	0.22	1.31	0.77	0.36			0.50
			0.17	0.13	0.78	0.58	0.85	1.07	0.44	1.38	0.14	0.26	1.34	0.33	1.52	0.35	0.16
			0.10	0.38	0.37	0.31	0.41	1.22	0.00	2.84	0.04	0.88			0.56	0.52	0.09
729	G236W	a	0.32	0.39	1.71	0.18	0.52	0.55	0.67	0.30	0.33	0.33	0.98	0.34			0.63
			0.78	0.17	2.13	0.40	0.70	0.51	0.29	0.69	0.29	0.20	1.40	0.26	1.52	0.36	0.41
			0.68	0.27	1.23	0.27	0.83	0.21	1.56	0.15	0.34	0.13			0.56	0.51	0.40
730	G236P	a	0.04	0.48	0.25	0.30	0.27	1.53	0.42	0.41	0.19	28.37	1.25	0.35			0.70
			0.15	0.16		7.93	0.90	10.17	0.15	0.68	0.10	0.23	1.38	0.86	1.41	0.37	0.11
			0.04	0.47	0.11	0.72	0.24	0.76	0.10	1.03	0.07	0.21			0.66	0.52	0.30
731	G237D	a	0.18	0.55	0.21	2.59	54.08	9.16	2.51	0.27			1.50	0.37			
			0.10	0.25		8.65	1.00	0.27	1.13	0.52	0.13	0.19	2.86	0.27	1.84	0.36	0.13
			0.08	0.33			1.04	0.19	0.74	0.17					0.80	0.50	

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIf
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
732	G237E	a	0.01	0.48	0.26	9.34	0.88	0.24	1.03	0.32	0.21	12.54	0.89	0.36			0.24
			0.09	0.13	0.70	0.95	0.88	0.45	0.42	0.48	0.02	0.60	1.16	0.24	1.36	0.42	0.02
733	G237N	a	0.02	0.40	0.27	13.28	0.65	0.38	2.79	0.26	0.18	5.37	0.71	0.36			0.27
			0.08	0.24	0.10	0.62	0.98	0.26	0.73	0.43	0.02	1.05	1.29	0.24	1.39	0.36	0.02
734	G237Q	a	0.01	0.39	0.26	14.91	0.85	8.46	1.20	0.30			0.84	0.34			
			0.07	0.32	0.46	4.47	0.78	17.18	1.80	5.62	0.00	3.01	1.33	0.31	1.39	0.37	0.00
735	G237K	a	0.01	0.39	0.22	0.34	0.32	0.81	1.29	0.38	0.17	0.73	0.81	0.35			0.54
			0.09	0.18	0.32	0.63	0.74	0.73	0.32	0.56	0.10	0.28	1.52	0.29	1.47	0.36	0.13
			0.02	0.56			0.46	0.27	0.11	0.85	0.07	2.82			1.28	0.48	0.15
736	G237R	a	0.01	0.38	0.21	0.32	0.48	0.83			0.21	0.66	0.73	0.35			0.43
			0.08	0.20		41.28			0.39	1.04	0.16	0.28	1.01	0.34	1.36	0.36	
737	G237S	a	0.03	0.42	0.17	1.31	0.75	0.34	1.94	0.26			1.04	0.33			
			0.12	0.15		6.61	1.02	0.24	0.78	0.53	0.07	0.49	1.86	0.34	1.29	0.36	0.06
738	G237T	a	0.05	0.54			0.50	0.68	0.77	0.29			0.69	0.35			
			0.13	0.18		5.66			0.21	0.72	0.09	0.21	1.08	0.35	1.32	0.38	
739	G237H	a	0.06	0.25	0.24	0.38	0.59	0.29	1.76	1.61	0.09	0.24	0.97	0.36	1.48	0.36	0.15
740	G237V	a	0.03	0.26			1.07	0.83	1.81	0.40	0.06	0.41	2.03	0.24	1.00	0.19	0.06
741	G237L	a	0.01	0.35			0.54	0.81	1.19	0.46	0.03	0.56	1.88	0.29	1.21	0.25	0.06
742	G237I	a					0.29	0.84	0.43	0.56	0.35	0.21	1.51	0.28	0.60	0.70	1.18
			0.02	0.22							0.40	0.15			1.01	0.27	
743	G237F	a	0.07	0.36			0.41	0.73	1.08	0.45	0.04	0.56	1.65	0.29	0.81	0.28	0.11
744	G237M	a	0.04	0.32			0.30	0.58	1.06	0.49	0.06	0.65	1.80	0.27	0.94	0.25	0.18
			0.07	0.37	0.14	0.35	0.57	0.26	0.66	0.27	0.10	0.15			1.74	0.45	0.17
745	G237Y	a	0.21	0.44			0.37	0.58	0.67	0.71	0.08	0.22	2.06	0.32	1.00	0.21	0.21
746	G237W	a	0.04	1.92			2.62	0.83	1.92	0.38			0.85	0.24	1.20	0.21	
747	G237P	a	0.02	0.18			0.52	0.90	0.52	0.51	0.01	0.69	1.17	0.25	1.21	0.21	0.02
748	P238D	a	0.26	0.32			13.02	1.16	5.89	0.39	0.72	0.25	1.03	0.24	0.63	0.89	0.06
			0.07	0.24							0.58	0.13			1.03	0.21	
749	P238E	a	0.95	0.29			1.18	0.86	1.46	0.41			3.53	1.20	0.25	3.71	1.18
			0.30	0.14							0.04	0.32			0.68	0.28	
			0.19	0.34			0.42	0.33	0.36	0.19	0.05	0.61			1.43	0.62	0.12
750	P238N	a	0.21	0.31			0.53	0.91	1.11	0.49			0.99	0.22	1.15	0.99	
			0.09	0.16							0.01	1.23			1.01	0.28	
751	P238Q	a															
752	P238K	a		1.05			0.24	0.59	0.20	0.85			1.00	0.25	5.01	0.83	
			0.04	8.30							0.00	3.28			0.77	0.29	
753	P238R	a	0.17	0.32			0.35	0.58	0.54	0.67	0.62	0.20	1.18	0.24	0.83	0.66	1.78
			0.25	0.21	0.31	3.96					0.50	0.16			0.92	0.26	
754	P238S	a	0.29	0.31			0.31	0.55	0.75	0.77			3.07	0.97	0.27	0.42	0.60
			0.44	0.12							0.08	0.17			0.93	0.22	
			0.57	0.26	0.15	0.38	0.63	0.40	1.08	0.22	0.23	0.13			1.12	0.51	0.37
755	P238T	a	0.21	0.35			0.60	0.66	0.78	0.54			3.34	1.51	0.30	0.91	0.61
			0.11	0.22	0.26	277					0.02	0.64			1.12	0.19	
756	P238H	a	0.44	0.35			1.89	0.85	1.35	0.41	1.51	0.18	1.32	0.24	0.90	0.53	0.80
			0.26	0.09	0.32	2638					1.12	0.13			1.46	0.22	
757	P238V	a	1.09	0.28			2.24	0.91	1.99	0.38			2.80	1.55	0.28	1.43	0.57
			1.22	0.18	0.38	0.37					0.06	0.43			1.09	0.19	
758	P238L	a	1.78	0.31			2.54	0.95	3.64	0.41	0.79	0.22	2.34	0.29	1.71	0.54	0.31
			1.17	0.14	0.31	12.20					0.69	0.15			1.40	0.30	
759	P238I	a	1.32	0.29			0.40	0.82	0.38	0.73			1.79	0.29	1.06	0.52	
			0.62	0.21							0.02	0.77			1.44	0.26	
760	P238F	a	1.70	0.31					3.72	0.38			2.56	2.32	0.32	2.41	0.55
			2.60	0.12							0.02	0.84			1.09	0.26	
761	P238M	a	1.38	0.27			0.44	0.66	1.27	0.44			2.89	3.23	0.35	2.33	1.22
			1.39	0.09							0.03	0.55			0.91	0.24	
762	P238Y	a	0.66	0.26			0.43	0.62	0.99	0.56			6.35	1.16	0.29	0.80	0.54
			3.05	0.20											0.92	0.21	
763	P238W	a	1.27	0.27			0.73	0.69	1.12	0.53			2.95	1.92	0.31	0.10	0.54
			0.73	0.21											1.30	0.20	
764	P238G	a	0.33	0.35			1.30	0.86	0.84	0.41	0.39	0.21	1.41	0.26	0.12	0.53	0.30
			0.11	0.16	0.34	0.27					0.36	0.20			1.53	0.22	
765	E269K	a	0.14	0.36			1.00	0.79	0.95	0.44			1.46	0.26	0.13	0.53	
			0.08	0.17							0.14	0.12			1.23	0.20	
766	E269S	a	0.31	0.30			0.74	0.77	1.19	0.44	0.30	0.20	0.93	0.28	0.13	0.55	0.41
			0.21	0.15	0.29	8.99					0.21	0.20			1.31	0.33	
767	E269V	a	0.30	0.29			0.35	0.80	0.32	0.68			4.69	1.48	0.28	0.13	0.52
			0.24	0.17	0.26	34.19					0.19	0.54			1.38	0.28	
768	E269I	a	0.35	0.29			0.29	0.63	0.40	0.42			2.10	0.40	0.13	0.52	
			0.41	0.22	0.28	1372					0.12	0.24			1.26	0.30	
769	E269M	a	0.38	0.25			0.37	0.58	0.66	0.58			14.73	2.66	0.34	0.14	0.52
			0.51	0.14							0.12	0.16			1.11	0.24	
770	E269W	a	0.20	0.29			0.34	0.55	0.92	0.62			1.83	1.43	0.32	0.08	0.52
			0.37	0.19							0.06	0.38			1.19	0.22	

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:I Ib	
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf		
771	E269P	a	0.36	0.16	0.13	0.41	0.73	0.25	1.33	0.66	0.02	0.70	0.00	12605	1.23	0.21	0.02	
772	E269G	a			0.58	0.54	0.51	0.28	1.11	0.66	0.03	0.63	0.00	7.64	1.34	0.18	0.05	
			0.39	0.29	0.23	0.37	0.58	0.28	0.44	0.51	0.23	0.16		1.18	0.50	0.39		
773	H285D	a	1.81	0.16	1.57	0.54	1.18	0.33	2.56	0.72	1.22	0.64	0.00	7.64	2.40	0.27	1.03	
774	H285E	a	1.67	0.25	1.39	0.32	0.98	0.29	1.53	0.35	1.46	0.19		1.93	0.50	1.50		
775	H285Q	a	2.42	0.16	1.68	0.55	0.66	0.45	1.45	0.67	0.33	0.60	0.00	7.64	1.25	0.27	0.50	
			1.28	0.22	1.41	0.29	1.81	0.22	2.15	0.17	1.59	0.16		1.38	0.49	0.88		
776	H285K	a	1.80	0.20	2.04	0.50	1.37	0.37	2.89	0.80	2.46	0.66	0.00	7.64	1.76	0.30	1.79	
777	H285Y	ap	2.68	0.31	1.95	0.56	0.95	0.49	4.24	1.43	1.77	0.97		1.25	0.24	1.87		
778	H285W	a	1.32	0.14	0.84	0.41	1.31	0.23	2.37	0.66	0.69	0.48	0.00	7.65	1.33	0.17	0.53	
779	N286E	a			3.40	0.07	0.40	0.38	0.25	0.37	0.94	0.01	1.71	0.00	7.65	2.12	0.18	0.03
780	N286Y	a			2.92	0.07	0.44	0.42	0.22	1.16	0.66	0.02	0.62	0.00	7.66	1.45	0.17	0.05
781	N286P	a	2.62	0.15	1.80	0.40	2.35	0.23	5.43	0.62	1.18	0.51	0.17	8.96	2.31	0.18	0.50	
			1.16	0.28	1.05	0.32	2.50	0.21	3.86	0.13	0.71	0.11		2.90	0.49	0.29		
782	N286G	a																
783	K288D	a	2.19	0.10			1.85	0.21			1.78	0.18					0.96	
784	K288E	a	2.76	0.14	1.72	0.41	3.27	0.26	8.05	0.63	2.77	0.52	0.00	7.64	0.89	0.19	0.85	
785	K288Y	a	2.17	0.13	1.80	0.53	1.14	0.27	2.71	0.64	0.69	0.54	0.00	7.64	1.10	0.19	0.61	
786	R292D	a	2.38	0.17	5.10	0.39	1.12	0.25	2.81	0.68	0.51	0.50	0.00	7.64	1.67	0.22	0.46	
787	R292E	a	1.56	0.13	1.00	0.44	0.73	0.41	4.46	4.23	0.34	0.50	0.00	7.64	1.45	0.22	0.47	
788	R292T	a	1.30	0.15	1.11	0.40	0.95	0.24	1.11	0.75	0.41	0.51	0.25	8.57	0.85	0.18	0.43	
789	R292Y	a	1.59	0.13	0.35	0.40	0.86	0.27	2.24	0.60	0.40	0.50	0.00	7.65	1.36	0.16	0.47	
790	T335N	a	1.89	0.12	1.21	0.40	1.27	0.22	2.14	0.64	0.85	0.51	0.00	7.65	1.23	0.16	0.67	
791	T335S	a	2.02	0.14	6.31	0.38	1.27	0.22	2.70	0.68	1.43	0.58			1.42	0.16	1.12	
792	T335H	a	2.26	0.19	1.31	0.45	1.07	0.24	1.67	0.67	1.25	0.61	0.00	7.65	1.16	0.21	1.17	
793	T335V	a	2.33	0.13	1.80	0.53	0.97	0.27	2.53	0.72	1.41	0.63	0.00	7.64	1.25	0.17	1.46	
794	T335L	a	2.48	0.18	1.96	0.51	2.62	0.32	14.39	0.70	2.22	0.50	0.00	2101	1.50	0.26	0.85	
795	T335I	a	2.25	0.15	2.47	0.50	1.16	0.36	1.76	1.04	1.51	0.70	0.00	7.64	1.41	0.22	1.30	
796	T335F	a	1.21	0.11	0.71	0.41	1.21	0.24	1.70	0.76	0.49	0.54	0.25	9.47	1.19	0.17	0.40	
797	T335M	a	2.06	0.12	0.60	0.41	1.13	0.26	1.98	0.64	0.52	0.51	0.00	7.65	0.79	0.19	0.46	
			1.31	0.24	1.14	0.26	1.13	0.24	1.46	0.13	1.18	0.10			1.35	0.48	1.04	
798	T335W	a	2.11	0.13	0.68	0.40	1.16	0.22	2.08	0.66	0.59	0.51			1.35	0.17	0.51	
799	T335P	a	2.80	0.12	2.42	0.46	0.93	0.26	1.75	0.65	1.35	0.60			1.45	0.17	1.45	
800	T335G	a	1.99	0.16	0.93	0.46	0.77	0.25	1.47	0.66	0.32	0.51			0.90	0.24	0.42	
801	D221K	a	4.53	0.19	4.32	0.39	3.50	0.28	17.75	0.61	65.60	0.48	0.00	7.64	5.66	0.18	18.72	
			0.97	0.25	1.01	0.30	0.68	0.40	1.04	0.17	2.82	0.09			1.84	0.46	4.17	
802	D221Y	a	2.43	0.19	2.62	0.44	2.41	0.28	10.01	0.67	0.56	0.48			2.74	0.21	0.23	
803	T223E	a	2.12	0.14	2.37	0.42	1.74	0.23	3.70	0.69	0.75	0.49	0.00	7.64	2.04	0.22	0.43	
804	T223K	a	1.61	0.17	2.18	0.29	1.81	0.25		11.88	9.37	0.36	1.31	0.30	2.97	0.36	5.19	
			1.15	0.27	0.55	0.27	0.60	0.23	0.41	0.26	0.67	0.12			0.78	0.60	1.11	
805	H224E	a	1.91	0.13	3.67	0.31	2.18	0.25		11.88	14.28	0.36	2.80	0.32	5.11	0.38	6.54	
			0.54	0.09	0.27	0.21	0.21	0.36	0.66	0.71	0.58	1.31			0.43	0.23	2.73	
806	H224Y	a	1.74	0.20	1.17	0.30	1.29	0.31		11.88	0.86	0.37	2.01	0.31	1.68	0.44	0.66	
807	T225E	a	2.28	0.16	2.75	0.30	2.38	0.25	97.09	11.88	9.84	0.36	1.96	0.31	4.89	0.47	4.14	
			0.46	0.14	0.35	0.19	0.44	0.44	1.21	0.66	0.76	1.31			0.41	0.16	1.71	
808	T225K	a	0.30	0.17	0.37	0.32	0.45	0.34	95.70	11.88	0.22	0.44	1.12	0.28	5.68	0.68	0.48	
			0.53	0.27	0.31	0.23	0.45	0.26	1.01	0.65	0.68	1.31			0.50	0.20	1.51	
809	T225W	a	2.30	0.29	1.04	0.42	1.44	0.24	93.33	11.88	0.59	0.37	1.92	0.29	6.89	0.75	0.41	
810	K246D	a	1.78	0.13	0.92	0.30	1.36	0.24	67.73	11.90	0.56	0.39	1.22	0.33	0.93	0.41	0.41	
811	K246E	a	1.58	0.15	1.25	0.28	0.98	0.32	35.41	11.89	2.86	0.40	1.86	0.33	0.51	0.38	2.91	
812	K246H	a	1.67	0.15	1.66	0.29	1.24	0.26		11.88	14.37	0.36	1.49	0.29	4.02	0.36	11.56	
			0.35	0.17	0.26	0.21	0.16	0.76	0.24	0.83	0.36	1.31			0.38	0.14	2.22	
813	K246Y	a	1.53	0.13	1.16	0.28	1.18	0.28	49.45	11.89	5.25	0.36	1.87	0.32	2.47	0.40	4.46	
814	D249Q	a	0.30	0.20	0.22	0.33	0.61	0.82	74.56	11.89	0.36	0.36	2.13	0.33	2.06	0.37	0.59	
			0.46	0.17	0.52	0.22	0.46	0.32	1.07	0.74	1.06	1.31			0.49	0.15	2.30	
815	D249H	a	0.39	0.14	0.37	0.23	0.28	0.46	0.64	0.78	0.86	1.32			0.41	0.19	3.04	
816	D249Y	a	1.80	0.14	1.87	0.29	1.13	0.28		11.88	3.92	0.37	2.09	0.30	2.57	0.45	3.47	
			0.47	0.17	0.37	0.39	0.55	0.34	0.79	1.42	7.49	42.72			0.41	0.22		
817	R255E	a	1.80	0.13	1.38	0.31	0.95	0.28	89.36	11.89	0.72	0.36	1.50	0.30	1.16	0.41	0.76	
818	R255Y	a	3.21	0.28	5.87	0.31	2.30	0.23		11.88	34.11	0.39	2.07	0.34	12.88	0.52	14.80	
			0.38	0.23	0.35	0.33	0.33	0.46	0.79	0.75	0.43	1.32			0.36	0.21	1.33	
819	E258S	a	2.79	0.30	1.13	0.34	1.39	0.27	40.92	11.92	0.65	0.56	1.36	0.32	0.54	0.52	0.47	
820	E258H	a	2.62	0.23	2.92	0.40	1.77	0.29	48.21	11.89	11.08	0.58	1.69	0.28	0.89	0.39	6.25	
821	E258Y	a	2.62	0.18	1.28	0.36	2.12	0.27		11.88	10.52	0.43	1.66	0.29	1.07	0.49	4.96	
			0.56	0.27	0.30	0.24	0.39	0.30	0.95	0.66	0.36	1.31			0.31	0.28	0.91	
822	T260D	a	1.79	0.16	0.58	0.32	0.65	0.29			0.31	0.37	4.06	0.32	1.71	0.53	0.47	
823	T260E	a	2.21	0.14	1.00	0.31	1.21	0.44	94.92	11.88	1.70	0.41	2.89	0.34	5.49	0.61	1.41	
824	T260H	a	2.03	0.20	1.85	0.34	1.70	0.29		11.88	11.25	0.43	1.63	0.28	7.30	0.53	6.61	
			0.52	0.16	0.27	0.19	0.16	0.93	0.50	0.77	0.53	1.32			0.50	0.16	3.40	
825	T260Y	a	1.59	0.16	0.84	0.37	1.03	0.27		11.88	0.48	0.38	1.62	0.27	7.51	0.93	0.47	
			0.38	0.32	0.59	0.29	0.51	0.26	1.08	0.65	1.40	1.31			0.69	0.18	2.73	
826	V262E	a	1.03	0.34	0.16	0.43	0.92	0.24	36.47	11.91			2.85	0.29	9.27	0.52		
827	V262F	a	1.04	0.15	0.43	0.28	1.23	0.26					5.20	0.39	0.50	0.38		

ES 2 530 340 T3

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRi		FcyRlla		FcyRllb		FcyRllc		FcyRllla		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
828	F275L	a	1.85	0.15	0.83	0.31	1.43	0.31	97.71	11.88	1.17	0.38	3.58	0.37	0.89	0.35	0.82
829	G281D	a p	2.19	0.17	1.81	0.29	2.15	0.23		11.88	4.55	0.38	6.23	0.38	1.33	0.36	2.11
830	G281K	a	1.25	0.15	1.01	0.26	1.20	0.29		11.88	0.79	0.39	1.92	0.30	0.95	0.35	0.66
831	G281Y	a	1.89	0.14	2.08	0.52	2.47	0.34		11.88	0.89	0.39	2.87	0.35	1.46	0.35	0.36
			0.42	0.18	0.80	0.21	0.73	0.27	1.17	0.64	1.31	1.31			0.69	0.14	1.79
832	G281P	a															
833	V282E	a	1.89	0.23	1.10	0.33	1.43	0.28	85.43	11.88	0.49	0.36	5.37	0.30	1.91	0.40	0.34
834	V282K	a	1.50	0.23	0.58	0.31	0.65	0.28	82.37	11.89	0.54	0.39	2.23	0.37	1.44	0.44	0.83
			0.40	0.20	0.85	0.19	1.26	0.23	1.76	0.64	2.97	1.31			1.11	0.17	2.37
835	V282Y	a	2.34	0.26	1.43	0.29	1.41	0.24		11.88	1.10	0.37	2.38	0.36	1.92	0.37	0.78
			0.37	0.16	0.53	0.22	0.49	0.40	0.86	0.72	0.89	1.32			0.65	0.18	1.83
836	V282P	a															
837	V282G	a p	1.41	0.19	1.58	0.18	1.12	0.39	1.08	0.70	0.98	0.26	8.93	0.45	1.16	0.18	0.87
838	E283K	a	2.47	0.14	1.20	0.16	2.81	0.28	3.63	0.64	3.26	0.22	1.25	0.35	2.74	0.94	1.16
839	E283H	a	4.36	0.41	3.56	0.24	3.85	0.36	2.13	0.71	27.06	0.35	3.62	0.40	6.25	1.29	7.04
			0.78	0.16	0.50	0.41	0.32	0.39	0.66	1.13					1.18	0.16	
840	E283L	a	1.44	0.15	4.67	0.12	6.05	0.28	9.30	0.65	22.32	0.26	3.95	0.40	9.25	0.69	3.69
			0.42	0.24	0.34	0.34	0.67	0.46	1.06	0.79	0.52	1.32			0.82	0.20	0.78
841	E283Y	a	1.68	0.16	1.19	0.15	1.51	0.30	0.85	0.71	1.43	0.23	2.35	0.49	1.42	0.68	0.94
842	E283P	a	1.56	0.18	0.95	0.23	2.51	0.32	1.14	0.71	1.65	0.26	3.62	0.50	1.33	0.41	0.66
843	E283G	a	0.47	0.11	0.33	0.24	0.45	0.27	0.89	0.68	0.43	1.31			0.77	0.20	0.97
844	V284E	a	1.45	0.17	5.92	0.13	4.86	0.30	2.89	0.66	18.48	0.28	2.72	0.57	25.76	0.15	3.80
			0.59	0.10	0.41	0.22	0.57	0.61	0.97	0.67	0.89	1.32			1.11	0.14	1.55
845	V284N	a	0.45	0.29	0.43	0.27	0.60	0.28	1.13	0.66	0.73	1.32			0.77	0.17	1.21
846	V284T	a p	0.25	0.18	0.41	0.17	1.26	0.47	1.08	0.67	1.16	0.23	4.49	0.57	1.15	0.16	0.92
			0.37	0.11	0.45	0.19	0.53	0.34	0.95	0.68	0.78	1.31			0.79	0.16	1.47
847	V284L	a	1.56	0.16	1.90	0.16	3.13	0.32	1.32	0.70	2.71	0.23	2.56	0.48	1.51	0.20	0.87
848	V284Y	a															
849	P291D	a	1.11	0.18	1.19	0.14	1.07	0.32	1.89	0.65	0.72	0.22	1.06	0.37	0.89	0.86	0.67
850	P291E	a	1.82	0.28	1.00	0.30	1.24	0.44	0.68	0.98	0.92	0.28	1.08	0.44	0.76	0.94	0.74
851	P291Q	a	1.06	0.17	1.40	0.16	1.81	0.32	1.33	0.65	0.80	0.31	1.26	0.40	1.24	0.51	0.44
852	P291T	a	0.55	0.18	0.49	0.14	1.00	0.34	0.67	0.73	0.53	0.25	1.44	0.40	0.94	0.44	0.53
853	P291H	a	1.85	0.18	2.66	0.23	1.47	0.29	1.35	0.73	2.40	0.28	0.75	0.39	2.56	0.57	1.63
854	P291I	a	1.24	0.25	1.20	0.13	1.19	0.34	2.15	0.67	0.52	0.25	1.30	0.41	1.15	0.17	0.44
855	P291G	a	0.08	0.29	0.35	0.22	1.26	0.37	0.68	0.75	0.31	0.24	2.19	0.41	0.81	0.18	0.24
			0.46	0.17	0.64	0.20	0.98	0.26	1.66	0.65	1.14	1.31			0.78	0.14	1.17
856	N297Q	a															
857	N297K	a															
858	N297R	a	0.01	0.20	0.01	0.80	0.01	2.77	0.06	1.66	0.01	3.89			0.45	0.17	1.03
859	N297T	a															
860	N297H	a															
861	N297V	a															
862	N297L	a															
863	N297I	a															
864	N297F	a															
865	N297M	a															
866	N297Y	a															
867	N297W	a															
868	N297P	a															
869	N297G	a															
870	R301D	a	0.87	0.16	0.11	0.60	0.06	2.49	0.04	2.89	0.03	1.45	1.58	0.43	0.50	0.24	0.47
871	R301E	a	0.62	0.23	0.36	0.15	0.84	0.43	0.44	0.73	0.69	0.24	2.71	0.49	2.92	0.99	0.82
872	R301H	a	1.65	0.25	0.37	0.24	0.97	0.64	0.74	0.93	0.41	0.30	1.58	0.48	0.76	0.98	0.42
873	R301Y	a	0.72	0.15	0.64	0.17	1.27	0.35	0.95	0.68	0.17	0.31	1.49	0.44	0.78	0.51	0.13
874	V303D	a	0.69	0.18	0.67	0.15	0.55	0.64	0.53	0.75	0.29	0.30	1.45	0.45	0.91	0.33	0.52
875	V303E	a	2.29	0.23	1.02	0.19	1.41	0.28	1.31	0.68	1.43	0.25	1.43	0.40	1.63	0.35	1.02
876	V303Y	a	0.78	0.18	2.56	0.21	1.43	0.33	1.26	0.73	0.44	0.25	1.02	0.42	1.15	0.16	0.31
877	S304D	a	1.12	0.19	0.53	0.29	1.17	0.57			0.14	0.28	2.17	0.52	0.61	0.20	0.12
878	S304N	a	0.95	0.18	0.69	0.19	0.81	0.42	0.90	0.90	1.08	0.25	1.32	0.41	1.19	0.19	1.34
879	S304T	a	1.00	0.15	2.86	0.18	1.61	0.31	0.73	0.80	6.13	0.21	3.30	0.48	2.86	1.08	3.80
880	S304H	a	1.11	0.29	0.32	0.31	0.79	0.97	1.65	15.76	0.18	0.28	1.59	0.50	0.38	0.97	0.23
881	S304L	a															
882	V305E	a	0.89	0.16	0.90	0.16	1.45	0.31	1.14	0.76	0.65	0.24	1.99	0.49	0.67	0.51	0.45
883	V305T	a	1.17	0.22	0.91	0.16	1.23	0.33	0.07	1.74	0.68	0.25					0.55
884	V305Y	a	1.59	0.22	0.98	0.24	0.95	0.31	0.22	1.23	0.66	0.30	1.12	0.49	0.74	0.30	0.70
885	K317E	a	0.85	0.18	0.79	0.22	0.48	0.55	0.29	0.95	0.39	0.72			0.45	0.56	0.81
886	K317Q	a	1.22	0.10			0.98	0.42			1.25	0.17					1.27
887	E318Q	a	0.62	0.14	0.80	0.18	0.35	0.37	0.72	0.33	0.40	0.70	0.99	0.55	0.56	0.66	1.17
888	E318H	a	0.49	0.15	0.46	0.35	0.38	0.45			0.26	1.71			0.61	0.21	0.69
889	E318L	a	1.05	0.37	0.67	0.23	0.18	1.28	0.87	0.45	0.38	0.71			3.61	1.60	2.12
890	E318Y	a	0.67	0.16	0.63	0.14	0.22	0.83	0.51	0.80	0.25	0.69			6.14	1.63	1.13
891	I336E	a	0.36	0.27	0.08	0.77	0.05	0.95	0.17	1.59	0.06	0.82	1.07	0.52	8.11	1.03	1.10
			0.70	0.44	0.38	0.29	0.34	0.59	1.02	0.86	1.79	1.33			0.64	0.21	5.20

Figura 41 (continuación)

Variante	Sustituciones	Contexto	FcyRI		FcyRIIa		FcyRIIb		FcyRIIc		FcyRIIIa		C1q		FcRn		Illa:IIb
			Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	Veces	Conf	
892	I336K	a	1.11	0.21	0.94	0.20	1.05	1.26	0.47	1.27	0.73	0.71	1.13	0.40	12.12	0.94	0.69
893	I336Y	a	0.45	0.15	0.28	0.19	0.59	0.50	0.64	0.68	0.21	0.71			0.49	0.50	0.36
894	S337E	a	0.71	0.17	1.15	0.18	1.13	0.27	0.95	0.24	0.74	0.69			0.39	0.47	0.65
895	S337N	a	0.77	0.20	1.45	0.24	1.50	0.37	0.93	0.50	0.58	0.75			0.52	0.48	0.39
896	S337H	a	0.66	0.14	0.78	0.14	0.64	0.29	0.85	0.25	0.35	0.69			0.56	0.51	0.55
912	S239D/E272Y/I332E	tr	1.98	0.18	3.33	0.30	12.09	0.30	9.89	0.23	43.67	0.12	0.88	0.96	1.31	0.27	3.61
913	S239D/E272S/I332E	tr	1.23	0.09	3.11	0.24	14.47	0.29	12.02	0.23	18.57	0.11	0.87	1.07	1.49	0.25	1.28
914	S239D/E272K/I332E	tr															
915	S239D/E272W/I332E	tr	3.23	0.07	7.99	0.24	22.11	0.30	18.91	0.23	64.80	0.10	1.07	0.75	1.81	0.23	2.93
916	S239D/E272Y/A330L/I332E	tr	1.83	0.12	0.89	0.28	2.92	0.34	3.04	0.23	46.36	0.12			1.00	0.25	15.90
917	S239D/E272S/A330L/I332E	tr															
918	S239D/E272K/A330L/I332E	tr															
919	S239D/E272I/A330L/I332E	tr	1.83	0.09	2.34	0.30	11.04	0.32	9.15	0.23	70.29	0.10	0.88	0.75	0.98	0.27	6.37
920	S239D/K274E/I332E	tr	3.20	0.09	3.66	0.31	26.79	0.34	14.88	0.23	86.88	0.10	1.23	0.70	0.60	0.27	3.24
921	S239D/Y278T/I332E	tr	0.04	0.15	0.26	16.94	1.36	1.57	0.75	0.38	0.60	0.14	1.12	0.74	0.21	0.51	0.44
922	S239D/K326T/I332E	trp	5.76	0.13	20.99	0.23	122	0.31	78.15	0.22	332	0.11	0.70	1.34	2.22	0.26	2.71
923	S239D/K326E/I332E	trp	2.87	0.18	4.08	0.29	59.31	0.29	35.60	0.22	184	0.11	0.89	1.20	0.64	0.27	3.10
924	S239D/K274E/A330L/I332E	tr	1.94	0.10	1.26	0.29	10.27	0.29	7.71	0.22	84.23	0.10	0.92	2.08	0.72	0.30	8.20
925	S239D/Y278T/A330L/I332E	tr															
926	S239D/K326E/A330L/I332E	tr															
927	S267E	r															
928	S239D/S267E/I332E	r															
929	S239D/S267E/A330L/I332E	r															
930	Y278W	r															
931	E283R/V302I/Y278W/E283R	r															
934	Y278W/V302I	r															
935	Y278W/E283R/V302I	r															
1145	S239D/I332E/G236S	t															
1146	S239D/I332E/G236A	t															
1147	S239D/I332E/K246H	t															
1148	S239D/I332E/R255Y	t															
1149	S239D/I332E/S267E	t															
1150	S239D/I332E/E272R	t															
1151	S239D/I332E/E272H	t															
1152	I332E/G281D	t															
1153	S239D/I332E/E283H	t															
1154	S239D/I332E/E283L	t															
1155	I332E/V284E	t															
1156	S239D/I332E/V284E	t															
1157	S267E/S324I	t															
1158	S267E/A327D	t															
1159	S324I/A327D	t															
1160	S267E/P331D	t															
1161	S267E/V282G	t															
1162	G281D/V282G	t															
1163	V282G/P331D	t															
1164	G281E	t															
1165	G281N	t															
1166	G281Q	t															
1167	V284D	t															
1168	V284Q	t															
1169	S298A/K326E	t															
1170	S298A/K334L	t															
1171	S298A/K326E/K334L	t															
1608	S239D/S298A/K326E/I332E	tp															
1609	S239D/S298A/K326T/I332E	t															
1877	I332E/H268E	p															
1878	I332E/H268D	p															
1879	S239D/H268E	p															
1880	S239D/H268D	p															
1881	S239D/I332E/H268E	p															
1882	S239D/I332E/H268D	p															
1883	S239D/I332E/A327D	p															
1884	S239D/I332E/V284D	p															
1885	S239D/I332E/V284E	p															

Figura 42

Sec. Con núm. De ident: 5

```

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
221          225          230          235

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Thr Leu Met
          240          245          250

Ile Ser Xaa Thr Pro Xaa Val Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          255          260          265

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          270          275          280

Xaa Xaa Ala Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
285          290          295          300

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Thr Val Leu His Gln Asp Xaa Leu Asn Gly
          305          310          315

Xaa Xaa Tyr Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          320          325          330

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
          335
    
```