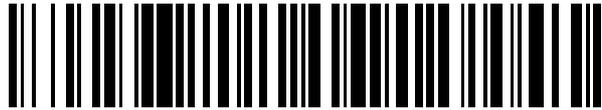


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 461**

51 Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008 E 08866130 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.02.2015 EP 2235059**

54 Título: **Variantes de FC con enlazamiento alterado a FCRN**

30 Prioridad:

26.12.2007 US 16793 P

25.02.2008 US 31353 P

18.04.2008 US 46353 P

02.05.2008 US 50172 P

10.07.2008 US 79779 P

22.09.2008 US 99178 P

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

27.03.2015

73 Titular/es:

**XENCOR, INC. (100.0%)
111 W. LEMON AVENUE
MONROVIA, CA 91016, US**

72 Inventor/es:

**CHAMBERLAIN, AARON;
DAHIYAT, BASSIL;
DESJARLAIS, JOHN RUDOLPH;
KARKI, SHER BAHADUR y
LAZAR, GREGORY ALAN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 532 461 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 con enlazamiento alterado a FCRN

Campo de la invención

5 La presente solicitud se relaciona con variantes de inmunoglobulina IgG optimizadas, métodos de ingeniería para su generación, y su aplicación, particularmente para propósitos terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se enlazan cada una a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo humanos y ratones, los anticuerpos son construidos a partir de cadenas de polipéptidos apareadas pesadas y livianas. Cada cadena está constituida de dominios de inmunoglobulinas individuales (Ig), y así el término genérico inmunoglobulina es utilizado para tales proteínas. Cada cadena está hecha de dos regiones distintas, denominadas como regiones variable y constante. Las regiones variables de cadena liviana y pesada muestran diversidad de secuencias significativa entre anticuerpos, y son responsables por el enlazamiento al antígeno objetivo. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia, y son responsables por enlazar un número de proteínas naturales para generar importantes eventos bioquímicos. En los humanos hay cinco clases diferentes de anticuerpos incluyendo IgA, (la cual incluye la subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (la cual incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e IgM. La característica distintiva entre estas clases de anticuerpos es sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias más sutiles en la región V. Los anticuerpos IgG son proteínas tetraméricas compuestas de dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas. La cadena pesada de IgG está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina enlazados desde el terminal N a C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, con referencia al dominio variable de cadena pesada, dominio 1 constante de cadena pesada, dominio 2 constante de cadena pesada, y dominio constante 3 de cadena pesada respectivamente (también denominadas como VH-Cy1-Cy2-Cy3, con referencia al dominio variable de cadena pesada, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2, y dominio constante gamma 3, respectivamente). La cadena liviana de IgG está compuesta de dos dominios de inmunoglobulina enlazados desde el terminal N a C en el orden VL-CL, con referencia al dominio variable de cadena liviana y al dominio constante de cadena liviana respectivamente.

25 En IgG, un sitio sobre Fc entre los dominios Cy2 y Cy3 media una interacción con el receptor neonatal FcRn. El enlazamiento a FcRn recicla anticuerpos endocitosados al esqueleto del endosoma a la corriente sanguínea (Raghavan et al., 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766). Este proceso, acoplado con la preclusión de la filtración en el riñón debida al tamaño grande de la molécula de longitud completa, da como resultado vidas medias en suero del anticuerpo favorable de una a tres semanas. El enlazamiento de Fc a FcRn también juega un papel importante en el transporte de anticuerpos. El sitio de enlazamiento sobre Fc para FcRn también es el sitio en el cual se enlazan las proteínas bacterianas A y G. El enlazamiento estrecho mediante 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 sobre Fc es importante tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos como para su purificación. Estructuras disponibles del complejo Fc/FcRn de rata (Burmeister et al., 1994, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7: 867-877), y de los complejos de Fc con las proteínas A y G (Deisenhofer, 1981, Biochemistry 20: 2361-2370; Sauer-Eriksson et al., 1995, Structure 3:265-278; Tashiro et al., 1995, Curr Opin Struct Biol 5:471-481), proveen una visión de la interacción de Fc con estas proteínas. El receptor de FcRn también es responsable por la transferencia de IgG a los intestinos neonatales y al lumen del epitelio intestinal en adultos (Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18:739-766; Yoshida et al., Immunity, 2004, 20(6):769-783).

40 Estudios de dominios Fc de ratas y humanos han demostrado la importancia de algunos residuos de Fc para el enlazamiento de FcRn. Las secuencias de ratas y humanos tienen aproximadamente 64% de identidad de secuencia en las regiones Fc (residuos 237-443 en la numeración del índice EU). Véanse figuras 3, 4 y 5 para los alineamientos rata/humano de la cadena pesada de Fc, FcRn, y cadena liviana para los alineamientos rata/humano de Fc, cadena pesada de FcRn y cadena liviana de FcRn (beta-2-microglobulina). Se ha construido un modelo del complejo Fc/FcRn humano a partir de la estructura existente del complejo de rata Fc/FcRn (Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877). Las secuencias de rata y humanos comparten algunos residuos que son críticos para el enlazamiento a FcRn, tales como H310 y H435 (Madesan et al., 1997 J. Immunol. 158(5):221-7; Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276(9):6591-6604). En muchas posiciones, sin embargo, las proteínas humanas y de rata tienen diferentes aminoácidos, dando los residuos en la secuencia humana diferentes ambientes, y posiblemente identidades diferentes, que en la secuencia en ratas. Esta variabilidad limita la capacidad de transferir características de un homólogo al otro homólogo.

En la Fc murínica, la mutación aleatoria y la selección de despliegue de fagos en los sitios T252, T254, y T256 lleva a un mutante triple, T252L/T254S/T256F, que tiene un incremento de 3.5 repeticiones en la afinidad por FcRn y un incremento de 1.5 repeticiones en la vida media en suero (Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15(7): 637-640). La perturbación de la

interacción Fc/FcRn por mutaciones en las posiciones 253, 310 y 435 también lleva a un descenso en la vida media *in vivo* (Medesan et al., J. Immunol. 1997 158(5): 2211-7).

5 Los estudios de mutaciones en Fc γ humana se han hecho en algunos de los residuos que son importantes para el enlazamiento a FcRn y han demostrado una vida media en suero incrementada. En Fc γ 1 humana, Hinton et al., mutaron tres residuos individualmente a los otros 19 aminoácidos comunes. Hinton et al., encontraron que algunos mutantes puntuales como un mutante doble incrementaron la afinidad de enlazamiento a FcRn (Hinton et al, 2004. J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216; Hinton et al., Journal Immunology 2006, 176: 346-356). Dos mutaciones han incrementado las vidas medias en monos. Shields et al., mutaron residuos, casi exclusivamente a Ala, y estudiaron su enlazamiento a FcRn y a las Fc γ R (Shields et al., 2001, Biol. Chem., 276(9): 6591-6604).

10 Dall'Acqua et al., utilizan despliegue de fagos para seleccionar mutaciones Fc que se enlazan con FcRn con afinidad incrementada (Dall'Acqua et al., 200, J. Immunol. 169: 5171-5180). Las secuencias de ADN seleccionadas fueron primariamente mutantes dobles y triples. La referencia expresó las proteínas codificadas por muchas de sus secuencias seleccionadas y encontró algunas que se enlazaban a FcRn más estrechamente que la Fc tipo silvestre.

15 La administración de anticuerpos y proteínas de fusión Fc como agentes terapéuticos requiere inyecciones con una frecuencia prescrita relacionada con las características de eliminación y vida media de la proteína. Vidas medias más largas *in vivo* permiten inyecciones más escasas o dosificaciones inferiores, lo cual es claramente ventajoso. Aunque las mutaciones pasadas en el dominio Fc han llevado algunas proteínas con afinidad de enlazamiento incrementada a FcRn y vidas medias *in vivo*, estas mutaciones no han identificado las mutaciones óptimas y potenciado la vida media *in vivo*.

20 Una característica de la región Fc es la glicosilación conservada enlazada a N que ocurre en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como se denomina a veces, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales de que los anticuerpos deben ser producidos utilizando sistemas de expresión de mamíferos. Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539-45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133-147; Radaev et al., 25 2001, J Biol Chem 276:16469-16477; and Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979-989).

Se han desarrollado anticuerpos para uso terapéutico. Publicaciones representativas relacionadas con tales terapias incluyen Chamow et al., 1996, Trend Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200, Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410, McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16:2825-2833, y Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17:2639-2648. Actualmente para terapia anticáncer, cualquier mejora pequeña en la rata de mortalidad define el éxito. Ciertas variantes de IgG divulgadas aquí potencian la capacidad de los anticuerpos para limitar el crecimiento posterior o destruir al menos parcialmente células cancerosas objetivo.

30

La potencia antitumoral de los anticuerpos es a través del potenciamiento de su capacidad para mediar funciones efectoras citotóxicas tales como ADCC, ADGP, y CDC. Ejemplos incluyen Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:652-656; Clynes et al. 2000, Nat Med 6:443-446 and Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758.

35 La IgG1 humana es el anticuerpo más comúnmente usado para propósitos terapéuticos, y la mayoría de los estudios de ingeniería genética han sido construidos en este contexto. Los diferentes isotipos de la clase IgG sin embargo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, tiene propiedades físicas, biológicas y clínicas únicas. Hay necesidad en la técnica por diseñar variantes mejoradas de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Hay una necesidad adicional para diseñar tales variantes para mejorar el enlazamiento a FcRn y/o incrementar la vida media *in vivo* en comparación con los polipéptidos de IgG nativos.

40 Adicionalmente, hay necesidad por combinar variantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas con variantes que comprenden modificaciones para mejorar la eficacia a través del enlazamiento alterado a Fc γ R. La presente solicitud satisface estas y otras necesidades.

Resumen de la invención

45 En un aspecto la invención provee un anticuerpo que comprende dos modificaciones con respecto a una región Fc humana tipo silvestre, en donde dichas modificaciones son 428L y 434S, en donde dicho anticuerpo tiene una vida media mayor en un mamífero en comparación con un anticuerpo sin dichas modificaciones, y en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU en Kabat et al., para uso como medicamento.

En otra realización, en donde dicha región Fc es seleccionada del grupo consistente de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En otra realización, dicho anticuerpo comprende una región de Fc IgG1.

En otra realización, dicho anticuerpo comprende una región de Fc IgG2.

En otra realización, dicho anticuerpo es para el tratamiento de un trastorno en un humano.

5 En otra realización, dicho anticuerpo tiene especificidad por un antígeno seleccionado del grupo consistente de: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor α de necrosis tumoral (TNF- α), CD25, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e IgE.

En otro aspecto se provee un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el medicamento es para el tratamiento de un trastorno seleccionado de enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas.

10 En otra realización, el trastorno es cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Alineamientos de secuencia de cadenas pesadas constantes de IgG humana. El gris indica diferencias con respecto a IgG, y los residuos en caja indican variaciones alotípicas comunes en la población humana.

Figura 2. (SEQ ID NO: 1-6) Secuencias de aminoácidos de regiones constantes usadas en la invención.

15 Figura 3. (SEQ ID NO: 7-12) Secuencias de aminoácidos de regiones constantes variables de ejemplo.

Figura 4. (SEQ ID NO: 13-22) Secuencias de aminoácidos de regiones variables VH y VL utilizadas en la invención.

Figura 5. (SEQ ID NO: 23-29) Secuencias de aminoácidos de anticuerpos variables de ejemplo.

20 Figura 6. Enlazamiento de VEGF relativo por WT y anticuerpos anti-VEGF de IgG1 variante seleccionados. La gráfica muestra las unidades de respuesta Biacore (RU) al final de la fase de asociación para enlazamiento del analito del anticuerpo a antígeno VEGF inmovilizado. Se utilizó anticuerpo anti-Her2 de IgG1 como control negativo.

Figura 7. Sensorgramas Biacore de WT y anticuerpos de IgG1 variables a FcRn humana inmovilizada a pH bajo (6.0) y alto (7.4).

25 Figura 8. Afinidades de enlazamiento a FcRn de WT y anticuerpos de IgG1 variables seleccionados a FcRn humana a pH 6.0 según se determina mediante Biacore. La gráfica muestra una representación de la constante de pseudoafinidad (K_a^*), en una escala logarítmica.

30 Figura 9. Enlazamiento relativo de anticuerpos anti-VEGF de IgG1 variables a FcRn humana según se determina mediante Biacore. La tabla muestra la repetición de K_a^* de cada variante con respecto a la IgG1 de WT humana (nativa). n indica el número de tiempo que cada variante fue probada, y Media y SD indican el promedio y la desviación estándar respectivamente para cada variante sobre n experimentos de enlazamiento. Las repeticiones de FcRn fueron calculadas para todas las variantes con respecto a IgG1 de WT dentro de cada experimento de enlazamiento respectivo. NB indica que no se detectó enlazamiento. ND indica que no se determinó enlazamiento para esa variante particular. NF indica que no fue posible el acoplamiento a partir de los datos de enlazamiento.

Figura 10. Enlazamiento relativo de los anticuerpos anti-VEGF de variantes IgG2 e IgG1/2 a FcRn humana según se determina mediante Biacore. La tabla es como se describe en la Figura 9.

35 Figura 11. Análisis de combinaciones de sustitución aditivas y sinérgicas. La Figura 11 a muestra una gráfica del enlazamiento a repeticiones determinado experimentalmente a FcRn humana por cada variante versus el enlazamiento a repeticiones de FcRn predicho según se determina mediante el producto de variantes individuales. Los puntos de datos variantes son marcados, y la línea representa aditividad perfecta. La Figura 11b muestra la diferencia entre repetición experimental y predicha para cada variante de combinación. La Figura 11c muestra la energía de cada combinación variante. El porcentaje de sinergia se calcula como $100 \times [(repetición\ experimental/repetición\ predicha) - 1]$.

40 Figura 12. Enlazamiento relativo de los anticuerpos variantes anti-TNF, -CD25, -EGFR e -IgE a FcRn humana según se determina mediante Biacore. La tabla es como se describe en la figura 9.

Figura 13. Farmacocinética *in vivo* de WT y anticuerpos variantes en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺. Las gráficas representan la concentración en suero de anticuerpo versus tiempo después de una dosis intravenosa individual. La Figura 13a muestra

datos a partir de los 4 estudios llevados a cabo con anticuerpos IgG1 (Estudio 3), y la Figura 13b muestra datos a partir de un estudio llevado a cabo con anticuerpos IgG2 (Estudio 5).

Figura 14. Parámetros de PK ajustados a partir de todos los estudios de PK *in vivo* llevados a cabo en ratones mFcRn-/hFcRn+ con anticuerpos variantes y WT. n representa el número de ratones por grupo, con los datos de Media y desviación estándar provistos por los parámetros PK. Vida Media representa la fase beta que caracteriza la eliminación de anticuerpos del suero. Cmáx es la concentración en suero máxima observada, AUC es el área bajo la curva de concentración tiempo y eliminación es la eliminación de anticuerpo del suero. La repetición de vida media es calculada como la vida media del anticuerpo variante sobre la de la IgG1 o IgG2 de WT progenitoras dentro de cada estudio.

Figura 15. Correlación entre vida media de los anticuerpos variantes de IgG1 (Figura 15a) e IgG2 (Figura 15b) en ratones mFcRn-/hFcRn+ y enlazamiento a repeticiones de FcRn con respecto a WT IgG1. Los datos sobre en el eje y son de la Figura 14, y los datos en el eje x son de las Figura 9 y 10. Las variantes seleccionadas están marcadas, y los datos variables de experimentos repetidos están encerrados en un círculo. La Figura 15c muestra los datos de correlación tanto de IgG1 como de IgG2, representando las líneas negra y gris los ajustes de los datos de Ig1 e IgG2 respectivamente.

Figura 16. (SEQ ID NO:30-35). Secuencias de aminoácidos de inmunoadhesinas de Fc anti-TNF variantes y progenitoras utilizadas en la invención.

Figura 17. Enlazamiento de las inmunoadhesinas anti-TNF al antígeno TNF determinado por Biacore.

Figura 18. Enlazamiento relativo de inmunoadhesinas Fc variantes a FcRn humana determinada por Biacore. La tabla muestra la repetición de Ka* de cada variante con respecto a IgG de WT humana (nativa). n indica el número de veces que cada variante fue probada, y Media y SD indican el promedio y la desviación estándar respectivamente para cada variante a lo largo de n experimentos de enlazamiento. La repetición de FcRn fue calculada para todas las variantes con respecto a la IgG progenitora dentro de cada experimento de enlazamiento respectivo.

Figura 19. Farmacocinética *in vivo* de inmunoadhesinas de Fc progenitora y variante en ratones mFcRn-/hFcRn+. Las gráficas representan la concentración en suero de fusión de Fc versus tiempo después de una dosis intravenosa individual.

Figura 20. Parámetros de PK ajustados a partir de la fusión de Fc en el estudio de PK *in vivo* en ratones mFcRn-/hFcRn+. Los parámetros son como se describen en la Figura 14. El porcentaje de incremento en vida media es calculado como 100 veces la vida media de la fusión Fc variante sobre la de las IgG1 o IgG2 de WT progenitoras.

Figura 21. Enlazamiento relativo de los anticuerpos anti-VEGF de IgG1 variante a FcRn de mono cynomolgus y humanos determinado por Biacore. La Figura 21a muestra los datos en forma tabular. La descripción de la figura es como en la figura 9, y los datos para enlazamiento a FcRn humana son tomados de la figura 9. La Figura 21b muestra una gráfica de los datos.

Figura 22. Farmacocinética *in vivo* de WT y anticuerpos variantes en monos cynomolgus. Las gráficas representan la concentración en suero de anticuerpo versus tiempo después de una dosis intravenosa individual.

Figura 23. Parámetros de ajuste de PK a partir del estudio de PK *in vivo* en monos cynomolgus con anticuerpos variantes y WT. Los parámetros son como se describe en la Figura 14.

Descripción detallada de la invención

La presente invención divulga la generación de novedosas variantes de dominios Fc, incluyendo los encontrados en anticuerpos, fusiones de Fc e inmunoadhesiones, los cuales tienen un enlazamiento incrementado al receptor de FcRn. Como se anota aquí, el enlazamiento a FcRn da como resultado una retención en suero más larga *in vivo*.

Con el fin de incrementar la retención de las proteínas de Fc *in vivo*, el incremento en la afinidad de enlazamiento debe estar alrededor de pH 6.0 a la vez que se mantiene una afinidad inferior alrededor de pH 7.4. Aunque están todavía bajo examen, se cree que la regiones Fc tienen vidas medias más largas *in vivo*, porque el enlazamiento a FcRn a pH 6.0 en un endosoma secuestra la Fc (Ghetie and Ward, 1997 Immunol. Today. 18(12): 592-598). El compartimiento endosómico recicla entonces la Fc a la superficie celular. Una vez que este compartimiento se abre al espacio extracelular, el pH más alto, ~7.4, induce la liberación de la Fc de regreso a la sangre. En ratones, Dall'Acqua et al., demostraron que los Fc mutantes con enlazamiento a FcRn incrementado a pH 6.0 y pH 7.4 realmente habían reducido las concentraciones en suero y tenían la misma vida media que la Fc tipo silvestre (Dall'Acqua et al., 2002, J. Immunol. 169: 5171-5180). La afinidad incrementada de Fc por FcRn a pH 7.4 se considera que prohíbe la liberación de la Fc de regreso a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones de Fc que incrementan la vida media de Fc *in vivo* idealmente incrementarían el enlazamiento de

FcRn al pH más bajo mientras que permiten aún la liberación de la Fc a pH más alto. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el rango de pH de 6.0 a 7.4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar residuos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn (Figura 6).

5 Un aspecto adicional de la invención es el incremento en el enlazamiento a FcRn sobre el tipo silvestre específicamente a pH más bajo, aproximadamente pH 6.0 para facilitar el enlazamiento Fc/FcRn en el endosoma. También se divulgan variantes de Fc con enlazamiento a FcRn alterado y enlazamiento alterado a otra clase de receptores de Fc, los FcγR (algunas veces escritos FcγR) puesto que se ha demostrado que el enlazamiento diferencial a FcγRs, enlazamiento particularmente incrementado a FcγRIIIb y enlazamiento particularmente disminuido a FcγRIIb, da como resultado una eficacia incrementada.

10 Definiciones

Con el fin de que la solicitud pueda ser entendida más completamente, se fijan varias definiciones a continuación. Se entienden que tales definiciones abarcan sus equivalentes gramaticales.

15 Por “ADCC” o “citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos” tal como se utiliza aquí se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconoce anticuerpos enlazados sobre una célula objetivo y subsecuentemente producen la lisis de la célula objetivo.

Por “ADCP” o “fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos” tal como se utiliza aquí se entiende la reacción mediada por células en donde células citotóxicas no específicas que expresan FcγRs reconoce el anticuerpo enlazado sobre una célula objetivo y subsecuentemente producen fagocitosis de la célula objetivo.

20 Por “modificación” se entiende aquí una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos o una alteración en una unidad estructural enlazada químicamente a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser una estructura de carbohidrato o PEG alterada unida a una proteína. Por “modificación de aminoácidos” se entiende aquí una sustitución, inserción y/o eliminación de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos.

25 Por “sustitución de aminoácidos” o “sustitución” se entiende aquí el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptidos progenitora con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la cual el ácido glutámico en la posición 272 es reemplazado con tirosina.

30 Por “inserción de aminoácidos” o “inserción”, tal como se utiliza aquí se entiende la división de una secuencia de aminoácidos a una posición particular en una secuencia de polipéptidos progenitora. Por ejemplo, -233E o ^233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Adicionalmente, -233ADE o ^233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

Por “eliminación de aminoácidos” o “eliminación” tal como se utiliza aquí se entiende la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia de polipéptidos progenitora. Por ejemplo, E233- o E233# designa una eliminación de ácido glutámico en la posición 233. Adicionalmente, EDA233- o EDA233# designa una eliminación de la secuencia GluAspAla que comienza en la posición 233.

35 Por “proteína variante” o “variante de proteína” o “variante” tal como se utiliza aquí se entiende una proteína que difiere de la de la proteína progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. La variante de proteína puede referirse a la proteína misma, a una composición que comprende la proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferiblemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos en comparación con la proteína progenitora, por ejemplo, desde aproximadamente una hasta aproximadamente setenta modificaciones de aminoácidos, y preferiblemente desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la progenitora. La secuencia de variante de proteína aquí poseerá preferiblemente al menos 80% de homología con una secuencia de proteínas progenitora, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. La proteína variante puede referirse a la proteína variante en sí misma, composiciones que comprenden la variante de proteína, o la secuencia de ADN que la codifica. De acuerdo con lo anterior, por “variante de anticuerpos” o “anticuerpo variante” tal como se utiliza aquí se entiende un anticuerpo que difiere de un anticuerpo progenitor en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, “variante de IgG” o “IgG variante” tal como se utiliza aquí se entiende un anticuerpo que difiere de una IgG progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, y “variante de inmunoglobulina” o “inmunoglobulina variante” tal como se utiliza aquí se entiende una secuencia de inmunoglobulina que difiere de la secuencia de inmunoglobulina progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. “Variante Fc” o “Fc variante” tal como se utiliza aquí significa una proteína que comprende una modificación en un dominio Fc. Las variantes Fc de la presente invención son definidas de acuerdo con las

50

modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, N434S o 434S es una variante de Fc con la sustitución de serina en la posición 434 con respecto al polipéptido de Fc original, en donde la numeración va de acuerdo con el índice EU. De la misma forma, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S. A con respecto al polipéptido de Fc original. La identidad del aminoácido de WT puede ser no especificada, en cuyo caso la variante antes mencionada se denomina como 428L/434S. Hay que anotar que el orden en el cual se proveen las sustituciones es arbitrario, es decir que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante de Fc que M428L/434S, y así sucesivamente. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración va de acuerdo con el índice EU. El índice EU o índice EU como en Kabat o esquema de numeración Eu se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85). La modificación puede ser una adición, eliminación o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos de origen natural y aminoácidos de origen no natural. Las variantes pueden comprender aminoácidos de origen no natural. Ejemplos incluyen US 6,586,207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PIGAS United States of America 99:11020-11024; and, L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10.

Tal como se utiliza aquí "proteína" significa al menos dos aminoácidos enlazados covalentemente, las cuales incluyen proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptídico puede comprender aminoácidos de origen natural enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas esto es, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20): 9367 (1992)). Los aminoácidos pueden ser bien de origen natural o de origen no natural; como será evidente por las personas en la técnica. Por ejemplo, la homo-fenilalanina, la citrulina y la noreleucina se consideran aminoácidos para los propósitos de la invención, y pueden utilizarse ambos aminoácidos configurados D- y L- (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz y colegas, incluyendo pero no limitándose a métodos descritos por Cropp & Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12): 625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101 (2): 7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656): 371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635): 964-7. Además, los polipéptidos pueden incluir la formación de derivados sintéticos de una o más cadenas o términos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclización, enlazadores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios de proteínas, y adición a etiquetas o marcadores de péptidos.

Por "residuo" tal como se utiliza aquí se entiende una posición en una proteína y su identidad de aminoácidos asociados. Por ejemplo, la asparagina 297 (también denominada como Asn297 o N297) es un residuo en la posición 297 en el anticuerpo humano de IgG1.

"Región Fab" tal como se utiliza aquí se entiende el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, Por "Fab" o VL y CL. Fab puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión Fab. Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv" tal como se utiliza aquí se entiende un polipéptido que comprende los dominios VL y VH de un anticuerpo individual.

Por "modificación de subclase IgG" tal como se utiliza aquí se entiende una modificación de aminoácido que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG al correspondiente aminoácido en un isotipo de IgG alineado, diferente. Por ejemplo, puesto que IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera como una modificación de subclase de IgG.

Por "modificación de origen no natural" tal como se utiliza aquí se entiende una modificación de aminoácidos que no es isotópica. Por ejemplo, puesto que ninguna de las IgG comprende una serina en la posición 434, la sustitución 434 es en IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 se considera como una modificación de origen no natural.

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácido" tal como se utiliza aquí se entiende uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquier análogo no natural que puede estar presente en una posición específica definida.

Por "función efectora" tal como se utiliza aquí se entiende un evento bioquímico que es el resultado de la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen pero no se limitan a ADCC, ADCP y CDC.

Por "ligando Fc de IgG" tal como se utiliza aquí se entiende una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se enlace a la región Fc de un anticuerpo de IgG para formar un complejo Fc/ligando Fc. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a FcγRs, FcγRs, FcγRs, FcRn, C1q, C3, lectina de enlazamiento a manano, receptor de manosa, proteína A de *estafilococos*, proteína G de *streptococos*, y FcγR viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor de Fc (FcRH), los cuales son una familia de receptores de Fc que son homólogos a la FcγRs (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se enlazan a Fc. Los ligandos Fc de IgG particulares son receptores FcRn y Fc gamma. Por "ligando de Fc" tal como se utiliza aquí, se

entiende una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se enlace a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc/ligando de Fc.

Por "receptor de Fc gamma", "FcγR" o "FcγgammaR" tal como se utiliza aquí se entiende cualquier miembro de la familia de proteínas que se enlaza a la región Fc del anticuerpo IgG y es codificado por un gen FcγR. En humanos esta familia incluye pero no se limita a FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIIb (incluyendo FcγRIIIb-1 y FcγRIIIb-2), y FcγRIIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como cualquier isoforma de FcγRs o FcγR humana no descubierta o alotipos. Una FcγR puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitándose a humanos, ratones, ratas, conejos y monos. La FcγRs de ratón incluye pero no se limita a FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16), y FcγRIII-2 (CD16-2), así como cualquier isoforma o alotipo de FcγRs o FcγR de ratón no descubierto.

Por "FcRn" o "preceptor de Fc neonatal" tal como se utiliza aquí se entiende una proteína que se enlaza a la región Fc del anticuerpo IgG y es codificado al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitándose a humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Como es sabido en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, frecuentemente denominados como la cadena pesada y la cadena liviana. La cadena liviana es beta-2-microglobulina y la cadena pesada es codificada por el gen FcRn. Al menos que se anote otra cosa aquí, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de cadena pesada FcRn con beta-2-microglobulina. Las secuencias de interés particular de FcRn se muestran en las Figuras, particularmente la especie humana.

Por "polipéptido progenitor" tal como se utiliza aquí se entiende un polipéptido no modificado que es modificado subsecuentemente para generar una variante. El polipéptido progenitor puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante de una versión manipulada de un polipéptido de origen natural. El polipéptido progenitor puede referirse al polipéptido mismo, composiciones que comprenden el polipéptido progenitor o la secuencia de aminoácidos que lo codifica. De acuerdo con lo anterior, por "inmunoglobulina progenitora" tal como se utiliza aquí se entiende un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que es modificado para generar una variante, y por "anticuerpo progenitor" tal como se utiliza aquí se entiende un anticuerpo no modificado que es modificado para generar un anticuerpo variante. Debe anotarse que "anticuerpo progenitor" incluye anticuerpos conocidos comerciales producidos por vía recombinante como se delinea más adelante.

Por "posición" tal como se utiliza aquí se entiende una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden ser numeradas secuencialmente, o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, el índice EU para la numeración de anticuerpos.

Por "antígeno objetivo" tal como se utiliza aquí se entiende la molécula que es enlazada específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno objetivo puede ser una proteína, carbohidrato, lípido u otro compuesto químico.

Por "célula objetivo" tal como se utiliza aquí se entiende una célula que expresa un antígeno objetivo.

Por "región variable" tal como se utiliza aquí se entiende la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes V_κ, V_λ y/o V_H que constituyen los loci genéticos de inmunoglobulina kappa, lambda y de cadena pesada respectivamente.

Por "tipo silvestre o WT" se entiende aquí una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentran en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no ha sido modificada intencionalmente.

La presente invención está dirigida a anticuerpos que exhiben un enlazamiento incrementado a FcRn con respecto a un anticuerpo de tipo silvestre. Por ejemplo, en algunos casos, el enlazamiento incrementado da como resultado un reciclaje celular del anticuerpo y por lo tanto una vida media incrementada. Además, los anticuerpos que exhiben enlazamiento incrementado a FcRn y enlazamiento alterado a otros receptores de Fc, por ejemplo, FcγRs, encuentran uso en la presente invención.

Anticuerpos

La presente solicitud está dirigida a anticuerpos que incluyen modificaciones de aminoácidos que modulan enlazamiento a FcRn. De interés particular son anticuerpos que comprenden mínimamente una región Fc, o una variante funcional de la misma, que despliega afinidad de enlazamiento incrementada a FcRn a pH disminuidos, y no exhibe un enlazamiento sustancialmente alterado a pH más altos.

Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, teniendo cada par una cadena "liviana" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotopo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. Las IgG tienen varias subclases, incluyendo, pero no limitándose a IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. La IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitándose a IgM1 e IgM2. Así, "isotipo" tal como se utiliza aquí significa cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humanos conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

La porción amino terminal de cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables primariamente por el reconocimiento de antígenos. En la región variable, se reúnen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena liviana para formar un sitio de enlazamiento al antígeno. Cada uno de los bucles se denomina como región determinante de la complementariedad (denominada de aquí en adelante como una "CDR"), en la cual la variación de la secuencia de aminoácidos es la más significativa.

La porción terminal carboxi de cada cadena define una región constante responsable primariamente por la función efectora. Kabat et al., recolectaron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas livianas. Con base en el grado de conservación de las secuencias, ellos clasificaron las secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de las mismas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th edition, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se entiende aquí una región de una inmunoglobulina que tiene una estructura terciaria distinguible. De interés en la presente invención son los dominios de la cadena pesada, incluyendo, los dominios pesados constantes (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos IgG tiene cada uno tres regiones CH. De acuerdo con lo anterior, los dominios "CH" en el contexto de IgG son como sigue: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice EU como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237-340 de acuerdo con el índice EU como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" o "región bisagra de la inmunoglobulina" se entiende aquí el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primero y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio IgG CH1 termina en la posición EU 220, y el dominio IgG CH2 comienza en el residuo en la posición EU 237. Así para el anticuerpo IgG bisagra se define aquí como la que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, la bisagra inferior está incluida, refiriéndose en general "bisagra inferior" a las posiciones 226 o 230.

De interés particular en la presente invención son las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc", tal como se utiliza aquí se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer domino de inmunoglobulina de región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Así Fc se refiere a los al menos dos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, los tres últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y el terminal N de bisagra flexible de estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, como se ilustra en la Figura 1, Fc comprende los dominios de inmunoglobulinas Cgamma2 y Cgamma3 (Cg2 y Cg3) y la región bisagra inferior entre Cgamma1 (Cg1) y Cgamma2 (Cg2). Aunque las fronteras de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define usualmente por incluir los residuos C226 o P230 hasta su terminal carboxilo, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región en aislamiento, o esta región en el contexto de un polipéptido de Fc, como se describe más adelante. Por "polipéptido de Fc" tal como se utiliza aquí se entiende un polipéptido que comprende todo o parte de una región Fc. Los polipéptidos de Fc incluyen los anticuerpo, fusiones Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" se entiende aquí la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo regiones variables y constantes, incluyendo una o más modificaciones como se delinea aquí.

Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras, incluyendo pero no limitándose a, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces denominados aquí como "imitadores de anticuerpos"), anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces denominadas aquí como "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

Fragmentos de anticuerpos

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. De interés particular son anticuerpos que comprenden regiones Fc, fusiones Fc y la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra- CH2-CH3) de nuevo, incluyendo también fusiones de regiones pesadas constantes.

5 Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab consistente de los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd consistente de los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv consistente de los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consiste de una variable sencilla, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados, (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados mediante un enlazador peptídico lo cual permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de enlazamiento a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) Fv de cadena sencilla biespecífico (WO 03/11161) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión de genes (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpos pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden ser estabilizadas mediante la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245).

Anticuerpos quiméricos y humanizados

En algunas realizaciones, los componentes del andamio pueden ser una mezcla de especies diferentes. Como tales, si la proteína es un anticuerpo, tal anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y las regiones constantes de un humano. "Anticuerpos humanizados" se refieren en general a anticuerpos no humanos que han tenido las regiones marco de dominio variable sustituidas por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. En general, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto la CDR, es codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de sus CDR. La CDR, algunas o todas las cuales son codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, son injertadas en el marco de lámina beta de la región variable de un anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad está determinada por las CDR injertadas. La creación de tales anticuerpos esta descrita, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. La "retromutación" de residuos de marcos aceptores seleccionados a los residuos donantes correspondientes se requiere frecuentemente para recuperar la afinidad que se pierde en el constructo injertado inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213). El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y así comprenderá típicamente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden ser generados utilizando ratones con un sistema inmune manipulado genéticamente. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. Una variedad de técnicas y métodos para humanizar y reconfigurar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el arte (Véase Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (Estados Unidos), y referencias citadas allí). Los métodos de humanización incluyen pero no se limitan a métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res. 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8. La humanización de otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variable de anticuerpos no humanos puede incluir métodos de reaparición en superficie, tales como los descritos por ejemplo en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973, e incorporados completamente como referencia. En una realización, el anticuerpo progenitor ha sido madurado por afinidad, como es sabido en el arte. Los métodos basados en la estructura pueden ser empleados para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo, como se describe en USSN 11/004,590. Los métodos basados en selección pueden ser empleados para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpos, incluyendo pero no limitándose a los métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden involucrar el injerto de solamente partes de las CDR, incluyendo pero no limitándose a métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084.

Anticuerpos biespecíficos

55

En una realización, los anticuerpos de la invención pueden ser anticuerpos multiespecíficos, y notablemente un anticuerpo biespecífico, algunas veces denominados también como "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se enlazan a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden ser manufacturados en una variedad de formas conocidas en el arte (Holliger and Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos.

5

Minicuerpos

En una realización, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprende una scFv enlazada a un dominio CH3. Hu et al., 1996, Cancer Res. 56: 3055-3061. En algunos casos, la scFv puede ser unida a la región Fc, y puede incluir una parte o la región bisagra completa.

10 Fusiones anticuerpos

En una realización, los anticuerpos de la invención son proteínas de fusión de anticuerpos (algunas veces denominadas aquí como "conjugados de anticuerpos"). Un tipo de fusión de anticuerpos comprende fusiones Fc, las cuales se enlazan a la región Fc con un asociado conjugado. Por "fusión a Fc" tal como se utiliza aquí se entiende una proteína en donde uno o más polipéptidos están enlazados operativamente a una región Fc. La fusión Fc se entiende aquí como sinónimo de los términos "inmuno adhesina", "fusión Ig", "Ig quimera", y "globulina receptora" (algunas veces con dashes) tal como se utiliza en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200). Una fusión Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con un asociado de fusión, el cual en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede estar enlazada a Fc para generar una fusión Fc. Los asociados de fusión proteínicos pueden incluir, pero no se limitan, a la región variable de cualquier anticuerpo, la región de enlazamiento objetivo de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Asociados de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión Fc a un objetivo terapéutico. Tales objetivos pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, el cual está implicado en la enfermedad. Así, las variantes IgG pueden ser enlazadas a uno o más asociados de fusión. En una realización alterna, la variante IgG es conjugada o enlazada operativamente a otro compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico puede ser un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radioisótopo, una citoquina, u otro agente terapéuticamente activo. La IgG puede estar enlazada a uno de una variedad de polímeros no proteínicos por ejemplo, polietileno glicol, propileno glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietileno glicol y polipropilenglicol.

15

20

25

Además de las fusiones Fc, las fusiones anticuerpo incluyen la fusión de la región constante de la cadena pesada con uno o más asociados de fusión (incluyendo de nuevo la región variable de cualquier anticuerpo), mientras que otras fusiones anticuerpo son sustancial o completamente anticuerpos de longitud completa con asociados de fusión. En una realización, un papel del asociado de fusión es mediar en el enlazamiento al objetivo, y así es funcionalmente análogo a las regiones variables de un anticuerpo (y en efecto puede serlo). Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede ser enlazada a Fc para generar una fusión Fc (o fusión anticuerpo). Los asociados de fusión proteínicos pueden incluir, pero no se limitan a, la región de enlazamiento objetivo de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina o alguna otra proteína o dominio de proteína. Los asociados de fusión de moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirija la fusión Fc a un objetivo terapéutico. Tales objetivos pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, el cual está implicado en la enfermedad.

30

35

El asociado conjugado puede ser proteínico o no proteínico; siendo generado este último generalmente utilizando grupos funcionales sobre el anticuerpo y sobre el asociado conjugado. Por ejemplo los enlazantes son conocidos en la técnica; por ejemplo, los enlazantes homo o heterobifuncionales son bien conocidos. (Véase, Catálogo 1994 Pierce Chemical Company, sección técnicas sobre entrecruzadores, página 155-200).

40

Conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, etiquetas como se describen más adelante, fármacos y agentes citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de tales toxinas. Toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y similares. Agentes citotóxicos incluyen agentes radioquímicos hechos por la conjugación de radioisótopos a anticuerpos, o el enlazamiento de un radionúclido a un agente quelante que ha sido enlazado de manera covalente al anticuerpo. Realizaciones adicionales utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitancina y duocarmicinas y análogos. Para estos últimos, véase U.S. 2003/0050331A1.

45

50

Modificaciones covalentes de anticuerpos

Las modificaciones covalentes de anticuerpos están incluidas dentro del alcance de esta invención, y son generalmente, pero no siempre, hechas postraducción. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivador orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con residuos terminales N o C.

5 Los residuos de cisteinilo lo más comúnmente se hacen reaccionar con α -haloacetatos (y aminos correspondientes) tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo pueden también ser derivados por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidozól)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

10 Los residuos de histidilo se derivan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil. La reacción se lleva a cabo preferiblemente en cacodilato de sodio 0.1M a pH 6.0.

15 Residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico y otros carboxílicos. La derivación con estos agentes tiene el efecto de reversar la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

20 Los residuos de arginilo son modificados por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivación de los residuos de arginina requiere que la reacción sea llevada a cabo en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Adicionalmente, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo arginina épsilon-amino.

25 La modificación específica de residuos tirosilo puede hacerse, con interés particular de introducción de etiquetas espectrales en residuos de tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo son yodados utilizando ¹²⁵I o ¹³¹I para preparar proteínas marcadas para utilizar en radioinmunoensayos, siendo también adecuado el método con cloramina T descrito más arriba.

30 Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) son modificados selectivamente por reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R'), donde R y R' son opcionalmente grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Adicionalmente, los residuos aspartilo y glutamilo son convertidos en residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

35 La derivación con agentes bifuncionales es útil para el entrecruzamiento de anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una variedad de métodos, además de los métodos descritos más adelante. Agentes de entrecruzamiento comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivación tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato produce intermediarios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en la presencia de luz. Alternativamente, matrices insolubles en agua reactivas tales como carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en la Patentes de los Estados Unidos Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; y 4,330,440, son empleadas para la inmovilización de proteínas.

40 Los residuos de glutaminilo y asparaginilo son frecuentemente desamidados a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Alternativamente, estos residuos son desamidados bajo condiciones moderadamente ácidas. Cualquier forma de estos residuos cae dentro del alcance de esta invención. Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y amidación de cualquier grupo carboxilo C terminal.

Glicosilación

50 Otro tipo de modificación covalente es la glicosilación. En otra realización, las variantes IgG divulgadas aquí pueden ser modificadas para incluir una o más glicofomas manipuladas. Por "glicofoma manipuladas" tal como se utiliza aquí se entiende una composición de carbohidrato que está enlazada covalentemente a una IgG, en donde dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de IgG progenitora. Las glicofomas manipuladas pueden ser útiles en una variedad

de propósitos, incluyendo pero no limitándose al potenciamiento o reducción de la función efectora. Las glicofomas manipuladas pueden ser generadas mediante una variedad de métodos conocidos en el arte (Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 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]; la tecnología de manipulación por glicosilación GlycoMab® [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Suiza]). Muchas de estas técnicas están basadas en el control de nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectantes que están enlazados covalentemente a la región Fc, por ejemplo expresando una IgG en diversos organismos o líneas celulares, manipulado o de alguna otra manera (por ejemplo células Lec-13 CHO o células YB2/0 de hibridoma de rata), regulando enzimas involucradas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando carbohidratos después de que la IgG ha sido expresada. La glicofoma manipulada típicamente se refiere a los diferentes carbohidratos u oligosacáridos; así una variante de IgG por ejemplo, un anticuerpo o fusión de Fc, puede incluir una glicofoma manipulada. Alternativamente, la glicofoma manipulada puede referirse a la variante de IgG que comprende el diferente carbohidrato u oligosacárido. Como es conocido en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, discutidos más abajo), o la célula anfitriona u organismo en el cual se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares son discutidos más abajo.

La glicosilación de polipéptidos es típicamente enlazada a N o enlazada a O. Enlazada a N se refiere a la unión de la unidad de estructural carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la unidad estructural carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también pueden utilizarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas más arriba (para sitios de glicosilación enlazados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia de partida (para sitios de glicosilación enlazados a O). Por facilidad, la secuencia de aminoácidos se altera preferiblemente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido objetivo en bases preseleccionadas tal que se generan codones que traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios de incrementar el número de unidades estructurales carbohidratos sobre el anticuerpo es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos puesto que no requieren producción de la proteína en una célula anfitriona que tenga capacidades de glicosilación para glicosilación enlazada a N u O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, los azúcares pueden ser enlazados a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de la serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos están descritos en WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306.

La remoción de unidades estructurales carbohidrato presentes en el anticuerpo de partida puede lograrse químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da como resultado la escisión de la mayor parte o todos los azúcares excepto el azúcar de enlazamiento (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que deja el polipéptido intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de unidades estructurales carbohidrato sobre polipéptidos puede lograrse mediante el uso de una variedad de endo y exoglicosidasas tal como lo describe Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. La glicosilación en sitios de glicosilación potenciales puede ser evitada mediante el uso del compuesto tunicamicina como lo describe Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de enlaces proteína-N-glicósido.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende el enlazamiento del anticuerpo a diversos polímeros no proteináceos, incluyendo, pero no limitándose a, diversos polioles tales como polietilén glicol, polipropilén glicol o polioxialquilenos, en la manera definida, por ejemplo, en 2005-2006 PEG catálogo de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio web de Nektar) Patentes de los Estados Unidos 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337. Además, como es conocido en la técnica, las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse en diversas posiciones dentro del anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase por ejemplo la publicación de los Estados Unidos No. 2005/0114037A1.

Anticuerpos marcados

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. En algunos casos, se consideran fusiones a anticuerpos. El término "grupo marcado" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador es acoplado al anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se conocen diversos métodos en la técnica para marcar proteínas y pueden ser utilizados para llevar a cabo la presente invención.

En general, los marcadores caen en una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el cual van a ser detectados: a) marcadores isotópicos, los cuales pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) unidades estructurales redox activas; d) colorantes ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo secuencias de par cremallera de leucina, sitios de enlazamiento para anticuerpos secundarios, dominios de enlazamiento a metales, etiquetas de epítopos, etc.). En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado con el anticuerpo a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Se conoce en la técnica diversos métodos para marcar proteínas y pueden ser utilizados en llevar a cabo la presente invención.

Los marcadores específicos incluyen colorantes ópticos, incluyendo, pero no limitándose a, cromóforos, fosforosos o fluoróforos, siendo este último específico en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser fluorescentes de "moléculas pequeñas", fluorescentes proteináceos.

Por "marcador fluorescente" se entiende cualquier molécula que pueda ser detectada a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil cumarina, pireno, verde de malaquita, estilbeno, Lucifer Yellow, Cascade BlueJ, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon green, the Alexa-Fluor dyes (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow and R-phycoerythrin (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rhodamine, and Texas Red (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Colorantes ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, están descrito en Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland.

Marcadores fluorescentes proteináceos adecuados también incluyen, pero no se limitan a, proteína fluorescente verde, incluyendo una especie de Renilla, Ptilosarcus, o Aequorea de GFP (Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., Genbank Accession Number U55762), proteína fluorescente azul (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canadá H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182), proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), luciferase (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417), β -galactosidasa (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607) y Renilla (WO92/15673, WO95/07463, WO98/14605, WO98/26277, WO99/49019, Patentes de los Estados Unidos Nos. 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Variantes de IgG

En una realización, la invención provee proteínas de IgG variantes. Como mínimo, las variantes de IgG comprenden un fragmento de anticuerpo que comprende la región CH2-CH3 de la cadena pesada. Además, las variantes de IgG adecuadas comprenden dominios Fc (por ejemplo, incluyendo la región bisagra inferior), así como variantes IgG que comprende la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra-CH2-CH3) siendo también útil en la presente invención, todas las cuales pueden ser fusionadas a asociados de fusión.

Una variante de IgG incluye una o más modificaciones de aminoácidos con respecto a un polipéptido de IgG progenitor, en algunos casos con respecto a la IgG tipo silvestre. La variante de IgG puede tener una o más propiedades optimizadas. Una variante de IgG difiere en secuencia de aminoácidos de su IgG progenitora en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Así las variantes de IgG tienen al menos una modificación de aminoácido en comparación con la progenitora. Alternativamente, las variantes de IgG pueden tener más de una modificación de aminoácido en comparación con la progenitora, por ejemplo desde aproximadamente una hasta cincuenta modificaciones de aminoácidos, preferiblemente desde aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, y lo más preferiblemente desde aproximadamente una hasta aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con la progenitora.

Así, las secuencias de las variantes de IgG y las de los polipéptidos Fc progenitores son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias variantes de IgG variante aquí poseerán aproximadamente 80% de homología con respecto a la

secuencia variante de IgG progenitora, preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. Las modificaciones pueden hacerse genéticamente utilizando biología molecular, o pueden hacerse enzimáticamente o químicamente.

Antígenos objetivo para anticuerpos

5 Virtualmente cualquier antígeno puede ser direccionado mediante las variantes de IgG, incluyendo pero o limitándose a proteínas, subunidades, dominios, motivos y/o epítopos que pertenecen a la siguiente lista de antígenos objetivo, la cual incluye tanto factores solubles tales como citoquina y factores enlazados a la membrana, incluyendo receptores transmembrana: 17-IA, 4-1BB, 4Dc, 6-keto-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, 10 Activina RIIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, 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 Atrial, av/b3 integrina, 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, 15 BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, bombesina, factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor de complemento 3 (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 (p67 proteínas), 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, 20 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 de citoqueratina asociado a tumor, DAN, DCC, DcR3, DCSIGN, factor de aceleración del decaimiento, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 de 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, Efrina 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 estimuladora del folículo, fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, 35 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, GITR, Glucagón, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, factor de liberación de la hormona de crecimiento, hapteno (tapa NP o tapa NIP), HB-EGF, HCC, glicoproteína de envoltura de HCMV gB, glicoproteína de envoltura de HCMV) gH, HCMV UL, factor de crecimiento hemopoético (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 de alto peso molecular asociado con melanoma (HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 loop, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de enlazamiento 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 1 de crecimiento similar a insulina, alfa integrina 2, alfa integrina 3, alfa integrina 4, alfa integrina 4/beta 1, alfa integrina alfa4/beta7, alfa integrina 5 (alfa V), alfa5/beta1 integrina, alfa5/beta3 integrina, alfa 6 integrina, beta 1 integrina, beta 2 integrina, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Kalikreina 2, Kalikreina 5, Kalikreina 6, , Kalikreina 11, Kalikreina 12, Kalikreina 14, Kalikreina 15, Kalikreina L1, Kalikreina L2, Kalikreina L3, Kalikreina L4, KC, KDR, 50 factor de crecimiento de queratinocito (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF-1), TGF-1Latente, TGF-1 Latente bp1, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, antígeno Lewis-Y, antígeno relacionado con Lewis-Y, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectin, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, surfactante de pulmones, hormona luteinizante, receptor beta de linfotóxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, metaloproteasas, receptor de 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, mucin (Muc1), MUC18, sustancia de inhibición muelleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Neparilisina, 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 paratiroide, PARC,

5 PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherin, PCNA, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PGI2, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina de placenta (PLAP), PIGF, PLP, PP14, proinsulina, prorrelaxina, proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico para la próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, cadena A de relaxina, cadena B de relaxina, renina, F del virus sincitial respiratorio (RSV), RSV Fgp, Ret, factores reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINE, albúmina de suero, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDF, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína 72 asociada a tumores), TARC, TCA-3, receptores de células T, por ejemplo, receptor alfa/beta de células T), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatasa alcalina similar a PLAP testicular, TFR, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta Pan Specific, 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, Ck-1 de timo, hormona estimulante de tiroides, Tie, TIMP, TIQ, factor de tejidos, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNFalfa beta, TNF-beta2, TNF, 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), TNFRSF1 B (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 (4-1 BB 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), TNFSF1 B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (Ligando OX40 gp34, TXGP1), TNFSF5 (Ligando CD40 CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Ligando Fas Apo-1 Ligand, Ligando APT1), TNFSF7 (Ligando CD27 CD70), TNFSF8 (Ligando CD30 CD153), TNFSF9 (Ligando 4-1BB, Ligando CD137), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, receptor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno CA 125 asociado a tumor, carbohidrato relacionado con Lewis Y que expresa el antígeno asociado con tumor, 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 hormonas y factores de crecimiento.

35 Una persona experimentada en la técnica apreciará que la lista antes mencionada de objetivos se refiere no solamente a proteínas y biomoléculas específicas, si no a la ruta o rutas bioquímicas que las comprenden. Por ejemplo, la referencia a CTLA-4 como un antígeno objetivo implica que los ligandos y receptores que constituyen la ruta coestimuladora de células T, incluyendo CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28 y cualquier otro ligando o receptor no descubierto que se enlace a estas proteínas, también son objetivos. Así, objetivo, tal como se utiliza aquí se refiere no solamente a una biomolécula específica sino al conjunto de proteínas que interactúan con dicho objetivo y los miembros de la ruta bioquímica a la cual pertenece dicho objetivo. Una persona experimentada en la técnica apreciará adicionalmente que cualquiera de los antígenos objetivos antes mencionados, los ligando o receptores que los enlazan, u otros miembros de su correspondiente ruta bioquímica, pueden estar enlazados operativamente a las variantes Fc de la presente invención con el fin de generar una fusión Fc. Así, por ejemplo, una fusión Fc que apunta a EGFR podría ser construida enlazando operativamente una variante Fc a EGF-TGF-b, o cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que enlace a EGFR. De acuerdo con lo anterior, una variante Fc de la presente invención podría ser enlazada operativamente a EGFR con el fin de generar una fusión Fc que se enlace a EGF, TGF-b o cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que se enlace a EGFR. Así virtualmente cualquier polipéptido, sea un ligando, receptor o cualquier otra proteína o dominio de proteína, incluyendo pero no limitándose a los objetivos antes mencionados y a las proteínas que componen sus correspondientes rutas bioquímicas, puede ser enlazado operativamente a las variantes Fc de la presente invención para desarrollar una fusión Fc.

50 La selección de un antígeno adecuado depende de la aplicación deseada. Para el tratamiento anticáncer es deseable tener un objetivo cuya expresión esté restringida a las células cancerosas. Algunos objetivos que han demostrado ser especialmente adecuados para la terapia a anticuerpos son aquellos con funciones de señalización. Otros anticuerpos terapéuticos ejercen sus efectos bloqueando la señalización del receptor inhibiendo el enlazamiento entre un receptor y su ligando cognato. Otro mecanismo de acción de anticuerpos terapéuticos es a producir su regulación del receptor. Otros anticuerpos no trabajan por señalización a través de su antígeno objetivo. En algunos casos, se usan anticuerpos dirigidos contra agentes de enfermedades infecciosas.

55 En una realización, las variantes Fc de la presente invención se incorporan en un anticuerpo contra una citoquina. Alternativamente, las variantes Fc se fusionan o conjugan a una citoquina. Por "citoquina" tal como se utiliza aquí 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 et., 2001, *J Immunol Methods* 248: 91-101, las citoquinas pueden ser fusionadas a anticuerpos para proveer un arreglo de propiedades deseables. Ejemplos de tales citoquinas son linfoquinas, monoquinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están hormonas de crecimiento tales como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino. Hormona paratiroides; tiroxina: insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínicas tales como hormona estimulante de folículos (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de la placenta; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora de la mullerina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de nervios tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento por transformación (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento I y II similar a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (ILs) tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes, y equivalentes biológicamente activos de la citoquinas de secuencias naturales.

Las citoquinas y objetivos solubles, tales como los miembros de la superfamilia TNF son objetivos preferidos para uso con las variantes de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, anti-CTLA-4 y anti-TNF, o fragmentos de los mismos, son particularmente buenos anticuerpos para el uso de las variantes Fc que incrementan el enlazamiento a FcRn. Los agentes terapéuticos contra estos objetivos están involucrados frecuentemente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y requieren inyecciones múltiples a lo largo de períodos de tiempo largos. Por lo tanto, se prefieren particularmente vidas medias más largas en suero y tratamientos menos frecuentes, provistos por las variantes de la presente invención.

Un cierto número de anticuerpos y fusiones Fc que son aprobados para uso, en ensayos clínicos, o en etapa de desarrollo pueden beneficiarse de las variantes Fc de la presente invención. Estos anticuerpos y fusiones Fc se denominan aquí como "productos y candidatos clínicos". Así en una realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un rango de productos y candidatos clínicos. Por ejemplo, un cierto número de anticuerpos que apuntan a CD20 pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar al rituximab (Rituxan[®], IDEC/Genentech/Roche) (véase por ejemplo, US 5,736,137), el anticuerpo anti-CD20 quimérico aprobado para tratar el linfoma No-Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 actualmente 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, titulado "variantes de inmunoglobulina y usos de las mismas"). Un número de anticuerpos que apuntan a miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico incluyendo EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), puede beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a trastuzumab (Herceptin[®], Genentech) (véase por ejemplo US 5,677,171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado aprobado para el tratamiento de cáncer de seno; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg[™]), que está siendo desarrollado actualmente por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en US 4,753,894; cetuximab (Erbix[®], Imclone) (US 4,943,533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en pruebas clínicas para una variedad de cánceres; ABX-EGF (US 6,235,883), actualmente desarrollado por Abgenix-ImmuneX-Amgen; HuMax-EGFr (USSN 10/172,317), está siendo desarrollado actualmente por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (US 5,558,864; Murthy et al. 1987, *Arch Biochem Biophys.* 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, *J Cell Biochem.* 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, *Protein Eng.* 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, *J. Cell Biophys.* 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, *Br J Cancer.* 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al, 1996, *Br J Cancer*, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, *Int J Cancer*, 105(2):273-80); TheraCIM hr3 (YM Biosciences, Canadá and Centro de Inmunología Molecular, Cuba (US 5,891,996; US 6, 506,883; Mateo et al, 1997, *Immunotechnology*, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, *Proc Natl Acad Sci USA.* 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 realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath[®], Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado actualmente aprobado para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una variedad de anticuerpos o fusiones Fc que son sustancialmente similares a otros productos y candidatos clínicos, incluyendo pero no limitándose a murmonab 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 ozogamicin (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-TNF alfa, desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira[®]), un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Abbott, Humicade[™], un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Celltech, etanercept (Enbrel[®]), un fusión Fc anti-TNF alfa desarrollada por Immunex/Amgen, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABXMA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está siendo desarrollado por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Thorex (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 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 beta 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 and Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina1 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 receptora anti-HER que está siendo desarrollado por Genentech, factor antitejido (ATF), un anticuerpo de factor antitejido 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 (anteriormente 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, un 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 anticuerpo anti-CD23 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos del factor de migración antimacrófagos (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 de un antígeno anti-carcinoembrónico (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), un 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-TNFα que está siendo desarrollado por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citoquina que está siendo desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos de molécula 1 de adhesión anticelular (ICAM-1) (CD54) que está siendo desarrollado por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo del receptor 3 del factor de crecimiento anti-fibroblastos (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 del interferón anti-gamma que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, Anti-α5β1 Integrin, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, un 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.
- 50 Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden ser incorporados en los candidatos y productos clínicos antes mencionados, o en anticuerpos y fusiones Fc que son sustancialmente similares a ellos. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden ser incorporados en versiones de los candidatos y productos clínicos antes mencionados que son humanizados, madurados por afinidad, manipulados o modificados de alguna otra manera.
- 55 En una realización, los polipéptidos Fc de la presente invención se utilizan para el tratamiento de indicaciones autoinmunes, inflamatorias o de trasplante. Los antígenos objetivos y los productos y candidatos clínicos que son relevantes para tales enfermedades incluyen pero no se limitan a los anticuerpos anti-α4β7 integrina tales como el 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-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 ABXIL8, anticuerpos anti-interferón gamma, anticuerpos anti-TNF (TNF, TNFa, TNFa, TNF-alfa) tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren.

Las variantes Fc de la presente invención tales como las que tienen enlazamiento incrementado a FcRn pueden ser utilizadas en moléculas inhibitoras de TNF para proveer propiedades potenciadas. Las moléculas inhibitoras de TNF útiles incluyen cualquier molécula que inhiba la acción de TNF-alfa en un mamífero. Ejemplos adecuados incluyen la fusión Fc Enbrel[®] (etanercept) y los anticuerpos Humira[®] (adalimumab) y Remicade[®] (infliximab). Anticuerpos monoclonales (tales como Remicade y Humira) manipulados utilizando las variantes Fc de la presente invención para incrementar el enlazamiento a FcFn, puede traducirse en una mejor eficacia a través de una vida media incrementada.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos contra enfermedades infecciosas. Anticuerpos contra células eucariotas incluyen anticuerpos que apuntan a células de levadura, incluyendo pero no limitándose a *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guillermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *plasmodium falciparum*, y *Yarrowia lipolytica*.

Los anticuerpos contra células fúngicas adicionales también son útiles, incluyendo antígenos objetivo asociados con cepas de *Candida* incluyendo *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. lusitanae* y *C. maltosa*, así como especies de *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, y *Penicillium*, entre otros.

Los anticuerpos dirigidos contra antígenos objetivo asociados con protozoos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos asociados con *Trypanosoma*, especies de *Leishmania* incluyendo *Leishmania donovani*; , *Plasmodium spp.*, *Pneumocystis carinii*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, y *Cyclospora cayetanensis*.

Anticuerpos contra antígenos procariotas también son útiles, incluyendo anticuerpos contra bacterias adecuadas tales como procariotas patogénicas y no patogénicas incluyendo pero no limitándose a *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis*; *Vibrio*, e.g. *V. cholerae*; *Escherichia*, e.g. Enterotoxigenic *E. coli*, *Shigella*, e.g. *S. dysenteriae*; *Salmonella*, e.g. *S. typhi*; *Mycobacterium* e.g. *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Clostridium*, e.g. *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C.perfringens*; *Corynebacterium*, e.g. *C. diphtheriae*; *Streptococcus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; *Staphylococcus*, e.g. *S. aureus*; *Haemophilus*, e.g. *H. influenzae*; *Neisseria*, e.g. *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; *Yersinia*, e.g. *Y. lamblia*, *Y. pestis*, *Pseudomonas*, e.g. *P. aeruginosa*, *P. putida*; *Chlamydia*, e.g. *C. trachomatis*; *Bordetella*, e.g. *B. pertussis*; *Treponema*, e.g. *T. palladium*; *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Brucella spp.*, *F. tularensis*, *B. mallei*, *B .pseudomallei*, *B. mallei*, *B. pseudomallei* , *C. botulinum* , *Salmonella spp.*, *SEB V. cholerae toxin B*, *E. coli O157:H7*, *Listeria spp.*, *Trichosporon beigeli*, *Rhodotorula species*, *Hansenula anomala*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Listeria sp.*, *Mycoplasma sp.* y similares.

En algunos aspectos, los anticuerpos están dirigidos contra infecciones virales; estos virus incluyen, pero no se limitan a, incluyendo orthomixovirus, (por ejemplo, virus de la influenza), paramixovirus (por ejemplo virus sincicial respiratorio, virus de papera, virus de sarampión), adenovirus, rinovirus, coronavirus, reovirus, togavirus (por ejemplo virus de rubella), parvovirus, virus de la viruela (por ejemplo virus variola, virus de vacuna), enterovirus (por ejemplo poliovirus, virus Coxsackie), virus de la hepatitis (incluyendo A, B y C), virus de herpes (por ejemplo, virus de herpes simples, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), rotavirus, virus de Norwalk, hantavirus, arenavirus, rhabdovirus (por ejemplo virus de la rabia), retrovirus (incluyendo VIH, HTLV1 y -II), papovavirus (por ejemplo virus del papiloma), poliomavirus y picornavirus, y similares.

Propiedades optimizadas de variantes de IgG

La presente solicitud también provee variantes de IgG que están optimizadas para una variedad de propiedades terapéuticamente relevantes. Una variante de IgG que es manipulada o predicha para desplegar una o más propiedades optimizadas se denomina aquí como una "variante de IgG optimizada". Las propiedades más preferidas que pueden ser optimizadas incluyen pero no se limitan a afinidad potenciada reducida por FcRn y vida media *in vivo* incrementada o disminuida. Realizaciones adecuadas incluyen anticuerpos que exhiben afinidad de enlazamiento incrementada a FcRn a pH disminuido, tales como las asociadas a pH con endosomas, por ejemplo, pH 6.0, a la vez que mantienen una afinidad reducida a pH más altos, tales como 7.4, para permitir un consumo incrementado en los endosomas pero ratas de liberación normales. De la misma manera, estos anticuerpos con enlazamiento a FcRn modulado pueden tener opcionalmente otras propiedades deseables, tales como enlazamiento a FcγR modulado, tales como lo delineado en U.S.S.N.s U.S.S.N.s 11/174,287, 11/124,640, 10/822,231, 10/672,280, 10/379,392, y la Solicitud de Patente titulada variantes de inmunoglobulina

IgG con función efectora optimizada, presentada el 21 de octubre de 2005 con la solicitud No. 11/256,060. Esto es, las propiedades optimizadas también incluyen pero no se limitan a afinidad potenciada o reducida por una FcγR. En una realización opcional, las variantes de IgG están optimizadas para poseer afinidad potenciada para una FcγR activadora humana, preferiblemente FcγRIIIa además del perfil de enlazamiento a FcRn. En aún otra realización alterna opcional, las variantes de IgG están optimizadas para poseer afinidad reducida por el receptor inhibitor humano de FcγRIIb. Esto es, realizaciones particulares abarcan el uso de anticuerpos que muestran enlazamiento incrementado a FcRn, y enlazamiento incrementado a FcγRIIIa. Otras realizaciones utilizan el uso de anticuerpos que muestran enlazamiento incrementado a FcRn, y enlazamiento incrementado a FcγRIIIa. Estas realizaciones están anticipadas para proveer polipéptidos de IgG con propiedades terapéuticas potenciadas en humanos, por ejemplo funciones efectoras potenciadas y mayor potencia anticáncer. En una realización alterna, las variantes de IgG están optimizadas para tener una afinidad incrementada o reducida por FcRn y una afinidad incrementada o reducida por una FcγR humana, incluyendo, pero no limitándose a FcγRI, FcγRIIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIb incluyendo sus variaciones alélicas. Estas realizaciones son anticipadas para proveer polipéptidos de IgG con propiedades terapéuticas potenciadas en humanos, por ejemplo, vida media en suero incrementado y función efectora reducida. En otras realizaciones, las variantes de IgG proveen afinidad potenciada para FcRn y afinidad potenciada para una o más FcγRs, si bien se reduce la afinidad por una o más de otras FcγRs. Por ejemplo, una variante de IgG puede tener un enlazamiento potenciado a FcRn y FcγRIIIa, si bien un enlazamiento reducido a FcγRIIb. Alternativamente, una variante de IgG puede tener un enlazamiento reducido a FcRn y a FcγR's. En otra realización una variante de IgG puede tener afinidad reducida por FcRn y afinidad potenciada por FcγRIIb, si bien afinidad reducida a una FcγRs activadora. En aún otra realización, una variante de IgG puede tener vida media en suero incrementada y funciones efectoras reducidas.

Realizaciones preferidas comprende la optimización de enlazamiento a una FcRn y FcγR humanas, sin embargo en realizaciones alternas las variantes de IgG poseen afinidad potenciada o reducida por FcRn y FcγR de organismos no humanos, incluyendo pero no limitándose a roedores y primates no humanos. Las variantes de IgG que son optimizadas para enlazamiento a una FcRn no humana pueden encontrar uso en la experimentación. Por ejemplo, hay disponibles modelos de ratón para una variedad de enfermedades que permiten la prueba de propiedades tales como eficacia, toxicidad y farmacocinética para un candidato farmacéutico dado. Como es sabido en la técnica, las células cancerosas pueden ser injertadas o inyectadas en ratones para imitar un cáncer humano, un proceso denominado como xenoinjerto. Los ensayos de las variantes de IgG que comprenden variantes de IgG que son optimizadas para FcRn pueden proveer información valiosa con respecto a las características de eliminación de la proteína, sus mecanismos de eliminación y similares. Las variantes de IgG también pueden ser optimizadas para una funcionalidad potenciada y/o propiedades en solución en forma aglicosilada. Los ligandos de Fc incluyen pero no se limitan a FcRn, FcγRs, C1 q, y proteínas A y G, y pueden ser de cualquier fuente incluyendo pero no limitándose a humana, de ratón, de rata, de conejo, o mono, preferiblemente humana. En una realización preferida alternativamente, las variantes de IgG están optimizadas para ser más estables y/o más solubles que la forma aglicosilada de la variante IgG progenitora.

Las variantes de IgG pueden incluir modificaciones que modulan la interacción con ligandos Fc diferentes a FcRn y FcγRs, incluyendo pero no limitándose a proteínas de complemento, y homólogos del receptor de Fc (FcRHs). Los FcRHs incluyen pero no se limitan a FcRH1, FcRH2, FcRH3, FcRH4, FcRH5, y FcRH6 (Davis et al., 2002, Immunol. Reviews 190:123-136).

Preferiblemente, la especificidad del ligando de Fc de la variante de IgG determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante de IgG dada para propósitos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno objetivo y la enfermedad o indicación que está siendo tratada. Para la mayoría de los objetivos e indicaciones, el enlazamiento de FcRn potenciado puede ser preferible puesto que el enlazamiento de Fc a FcRn potenciado puede dar como resultado un incremento en la vida media en suero. Las vidas medias en suero permiten una dosificación menos frecuente o una dosificación más baja del agente terapéutico. Esto es particularmente preferible cuando el agente terapéutico es suministrado en respuesta a una indicación que requiere administración repetida. Para algunos objetivos e indicaciones, puede ser preferible una afinidad a FcRn disminuida. Esto puede ser particularmente preferible cuando una Fc variante con eliminación incrementada o vida media en suero disminuida es deseada, por ejemplo, en polipéptidos de Fc utilizados como agentes para generación de imágenes o radioterapia.

Pueden usarse variantes de IgG que comprendan variantes de IgG que provean afinidad potenciada por FcRn con FcγRs de activación potenciada y/o afinidad reducida por la FcγRs inhibitora. Para algunos objetivos e indicaciones, puede ser adicionalmente beneficioso utilizar variantes de IgG que provean selectividad diferencial para diferentes FcγRs activadoras; por ejemplo, en algunos casos el enlazamiento potenciado a FcγRIIIa y FcγRIIIa puede ser deseado, pero no a FcγRI, mientras que en otros casos, puede preferirse el enlazamiento potenciado solamente a FcγRIIIa. Para ciertos objetivos e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que alteran el enlazamiento a FcRn y potencian las funciones efectoras mediadas tanto por FcγR como por complementos, mientras que en otros casos puede ser desventajoso utilizar variantes de IgG que potencian el enlazamiento a FcRn, o la vida media en suero, y cualquier función efectora mediada por FcγR o mediada por complementos. Para algunos objetivos o indicaciones de cáncer, puede ser ventajosos reducir o eliminar una o más funciones efectoras, por ejemplo, anulando el enlazamiento a C1 q, una o más FcγR's, FcRn, o uno o

más ligandos de Fc. Para otros objetivos e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que provean enlazamiento potenciado a la FcγRIIb inhibidora, incluso nivel WT, enlazamiento reducido o eliminado a FcγRs activadora. Esto puede ser particularmente útil, por ejemplo, cuando la meta de una variante de IgG es inhibir la inflamación o una enfermedad autoinmune, o modular el sistema autoinmune de alguna manera. Puesto que las enfermedades autoinmunes son generalmente de larga duración y se da tratamiento en dosificaciones repetidas, su tratamiento con las variantes de Fc con vida media incrementada a partir de FcRn incrementada es particularmente preferido.

Pueden hacerse modificaciones para mejorar la estabilidad, solubilidad función o uso clínico de IgG. En una realización preferida, las variantes de IgG pueden incluir modificaciones para reducir la inmunogenicidad en humanos. En una realización la más preferida, la inmunogenicidad de una variante de IgG se reduce utilizando un método descrito en USSN 11/004,590. En realizaciones alternativas, las variantes de IgG son humanizadas (Clark, 2000, Immunol Today 21: 397-402 i).

Las variantes de IgG pueden incluir modificaciones que reducen la inmunogenicidad. Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen el enlazamiento de péptidos procesados derivados a partir de la secuencia progenitora a proteínas MHC. Por ejemplo, se manipularan modificaciones en aminoácidos de tal manera que no haya o haya un número mínimo de epítomos inmunes que sean predichos para enlazarse, con alta afinidad, a cualquier alelo MHC prevalente. Se conocen en la técnica varios métodos para identificar epítomos de enlazamiento a MHC en secuencias de proteínas y pueden ser utilizados para calificar epítomos en una variante de IgG. Véase por ejemplo WO 98/52976; WO 02/079232; WO 00/3317; USSN 09/903,378; USSN 10/039,170; USSN 60/222,697; USSN 10/754,296; PCT WO 01/21823; y PCT WO 02/00165; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561; WO 98/59244; WO 02/069232; WO 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927-5933; y Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353-2358. La información basada en secuencia puede ser utilizada para determinar la calificación de enlazamiento para una interacción péptido dado – MHC (véase por ejemplo Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942-948; Sturniolo et. al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561).

25 Manipulación de variantes de IgG

Las variantes de la presente invención pueden ser diseñadas por diversos medios. Las variantes, tal como se describen aquí pueden ser inserciones, eliminaciones, sustituciones, otras modificaciones o combinaciones de estos y otros cambios. Una realización particularmente novedosa de la presente invención es el diseño de inserciones y eliminaciones que mejoran o reducen el enlazamiento de un polipéptido Fc a un ligando de Fc. Tal como se divulgan aquí, las inserciones o eliminaciones pueden hacerse de tal forma que incrementen o disminuyan la afinidad del polipéptido de Fc por FcRn. Las inserciones y eliminaciones pueden ser diseñadas por metodologías racionales o por metodologías que incluyen el uso de componentes aleatorios, tales como creación de bibliotecas aleatorias o semialeatorias o de selección. Tales como la creación de bibliotecas o selecciones aleatorias o semialeatorias. En una relación alternativa, se divulgan sustituciones que incrementan o disminuyen la afinidad del polipéptido de Fc por FcRn.

35 Modificaciones del esqueleto: Inserciones y eliminaciones

Los polipéptidos de Fc variantes pueden ser creados sustituyendo un aminoácido variante en lugar del aminoácido original en una posición en el polipéptido de Fc. Sustituyendo uno o más aminoácidos por aminoácidos variantes en el polipéptido de Fc, se alteran las cadenas laterales en estas posiciones. Las sustituciones más útiles modifican las propiedades de Fc alterando las cadenas laterales de Fc. Las cadenas laterales sustituidas pueden interactuar directa o indirectamente con un patrón de enlazamiento a Fc que está asociado con una función o propiedad de Fc. La al menos una sustitución altera la estructura covalente de una o más cadenas laterales del polipéptido de Fc original.

Alternativamente, los polipéptidos de Fc variantes pueden ser creados de manera que cambian la estructura covalente del esqueleto del polipéptido de Fc original. Los átomos del esqueleto en las proteínas son el nitrógeno peptídico, el carbono alfa, el carbonilo o el carbono peptídico y el oxígeno carbonílico. Cambiando la estructura covalente del esqueleto se proveen métodos adicionales para alterar las propiedades de los polipéptido de Fc. La estructura covalente del esqueleto de Fc puede ser alterada mediante la adición de átomos en el esqueleto, por ejemplo, insertando uno o más aminoácidos, o la sustracción de átomos del esqueleto, por ejemplo, eliminando uno o más aminoácidos. La estructura covalente del esqueleto también puede ser alterada cambiando átomos individuales del esqueleto a otros átomos (Deechongkit et al., J Am Chem Soc. 2004. 126(51): 16762-71). Como es conocido en la técnica y se ilustra aquí, las inserciones o eliminaciones de aminoácidos en polipéptidos de Fc puede hacerse insertando o eliminando los correspondientes nucleótidos en el ADN que codifica el polipéptido de Fc. Alternativamente, como se sabe en la técnica, las inserciones o eliminaciones de aminoácidos pueden hacerse durante la síntesis de los polipéptidos de Fc.

El diseño de las inserciones o eliminaciones de aminoácidos que alteran la interacción del polipéptido de Fc con uno o más asociados de enlazamiento (por ejemplo, (Fc γ R, FcRn, C1q) puede hacerse considerando la estructura del complejo de polipéptido de Fc y su asociado de enlazamiento. En una realización menos preferida, el diseño puede hacerse considerando la estructura del polipéptido de Fc y la información acerca de la región de Fc involucrada en el enlazamiento del asociado de enlazamiento. Esta información puede ser obtenida por experimentos de mutagénesis, experimentos de despliegue de fagos, comparaciones de homología, modelación por ordenador y otros medios.

Las posiciones preferidas en las secuencias de aminoácidos para las inserciones o eliminaciones afectan las interacciones de enlazamiento de Fc, pero no afectan la estructura global, estabilidad, expresión o uso del polipéptido de Fc, y están involucrados en las interacciones del asociado de enlazamiento Fc/Fc. Para alterar el enlazamiento a FcRn del polipéptido de Fc, las posiciones 244-257, 279-284, 307-317, 383-390, y 428-435 son localizaciones de bucle preferidas para inserciones o eliminaciones (numeración del índice EU de Kabat et al., Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877). Para alterar el enlazamiento al receptor de Fc γ al polipéptido de Fc, las posiciones 229-239, 266-273, 294-299, y 324-331 son localizaciones de bucle preferidas para inserciones o eliminaciones (numeración del índice Eu de Kabat et al., PDB code 1 E4K.pdb Sondermann et al. Nature. 2000 406:267). Los bucles son regiones de polipéptido que no están involucradas en la estructura helicoidal alfa o de lámina beta. Las posiciones de bucle son posiciones que no están ni en las estructuras helicoidales alfa o de lámina beta (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, Chapter 1 pp2-67). Las posiciones de bucle son preferidas porque los átomos del esqueleto típicamente son más flexibles y menos probablemente involucrados en enlaces de hidrógeno en comparación con los átomos del esqueleto de hélices alfa y láminas beta. Por lo tanto, el alargamiento o acortamiento de un bucle debido a una inserción o eliminación de uno o más aminoácidos lleva menos probablemente a cambios grandes perturbadores en el polipéptido de Fc, incluyendo estabilidad, expresión u otros problemas.

Las inserciones y eliminaciones pueden ser utilizadas para alterar la longitud del polipéptido. Por ejemplo, en regiones bucle, la alteración de la longitud del bucle da como resultado una flexibilidad y entropía conformacional alteradas del bucle. Las inserciones en un bucle generalmente incrementarán la entropía conformacional del bucle, la cual puede ser definida como la constante de Boltzman multiplicada por el logaritmo natural en el número de conformaciones posibles (van Holde, Johnson and Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, New Jersey 1998, pp. 78). Al insertar al menos un aminoácido en un polipéptido, el número total de conformaciones disponibles para el polipéptido se incrementa. Estas conformaciones adicionales pueden ser beneficiosas para formar interacciones de Fc/asociado de enlazamiento a Fc puesto que el polipéptido de Fc puede ser uno de conformaciones adicionales en el enlazamiento de la proteína de enlazamiento de Fc. En este caso, la inserción puede llevar a interacciones más fuertes Fc/asociado de enlazamiento Fc. Si las conformaciones adicionales no se utilizan en la interfaz de enlazamiento, entonces la inserción puede llevar a interacciones más débiles de Fc/asociado de enlazamiento Fc, porque las conformaciones adicionales competirían con la conformación competente de enlazamiento. De la misma manera, la eliminación de un segmento de polipéptido también puede llevar a interacciones Fc/asociado de enlazamiento más fuertes o más débiles. Si la eliminación de un segmento, la cual reduce el número posible de conformaciones del esqueleto, remueve la conformación competente de enlazamiento, entonces la eliminación puede llevar a interacciones de Fc/asociado de enlazamiento de Fc más débiles. Si la eliminación no remueve la combinación competente de enlazamiento, entonces la eliminación puede llevar a interacciones Fc/asociado de enlazamiento de Fc más fuertes porque la eliminación puede remover conformaciones que compiten con la conformación competente de enlazamiento.

Las inserciones y eliminaciones pueden ser utilizadas para alterar las posiciones y orientaciones de los aminoácidos en el polipéptido de Fc. Puesto que las inserciones y eliminaciones producen un cambio en la estructura covalente del esqueleto, necesariamente producen un cambio en las posiciones de los átomos del esqueleto. La Figura 7 compara las posiciones en el esqueleto en algunos segmentos de bucle, marcados L1 a L4, en tres esqueletos diferentes. La estructura de esqueleto de referencia contiene cuatro segmentos de bucle, mientras que el esqueleto con eliminación carece del segmento L1 y el segmento de inserción comprende un segmento adicional antes, esto es, N-terminal a, el segmento L1. Las eliminaciones e inserciones producen el cambio más grande y en la estructura del esqueleto cerca del sitio de la inserción o eliminación. Al eliminar un segmento cerca del extremo terminal N del bucle, por ejemplo, el segmento L1, el bucle se acorta y los segmentos restantes desplazan su posición más cerca al terminal N del bucle. Esto tiene el efecto de mover el segmento L2 hacia la localización previa del segmento L1 y hacia el terminal N del bucle. Este cambio en la posición del segmento L2 hacia el segmento L1 puede fortalecer el enlazamiento del complejo Fc/asociado de enlazamiento de Fc y es preferido cuando hay información previa que sugiere que el aminoácido o aminoácidos localizados en L2 hacen interacciones favorables con el asociado de enlazamiento Fc, cuando se localiza en L1. Por ejemplo, si L2 contiene alanina y tirosina y la sustitución de dos aminoácidos L1 por alanina y tirosina previamente lleva a una variante de Fc con enlazamiento incrementado, entonces la eliminación de L1 puede crear una variante de Fc con afinidad incrementada por el asociado de enlazamiento de Fc.

De la misma forma, una inserción de un segmento de polipéptido en un polipéptido de Fc y en lado terminal N de un bucle hace que las posiciones de los segmentos del bucle se desplacen hacia el lado del terminal C del bucle. En la Figura 7, una

5 inserción de uno o más aminoácidos antes, esto es hacia el terminal N, el segmento L1 altera la conformación del esqueleto incluyendo un desplazamiento en el segmento L1 hacia el extremo terminal C del bucle. Este tipo de inserción es preferida cuando los aminoácidos localizados en el segmento 1 son conocidos por realizar interacciones favorables cuando se localizan en las posiciones L2, puesto que la inserción puede llevar a interacciones Fc/asociado de enlazamiento de Fc más fuertes. Si se desean interacciones más débiles Fc/asociado de enlazamiento de Fc, entonces la inserción puede ser utilizada para desplazar aminoácidos desfavorables hacia una nueva posición. Los segmentos insertados, eliminados y de referencia (L1 a L4 en la Figura 7) pueden ser uno o más de un aminoácido en el polipéptido de Fc.

10 Alternativamente, pueden utilizarse inserciones o eliminaciones en el extremo terminal C de los bucles de una manera análoga a las inserciones o eliminaciones en el extremo terminal N de los bucles. Las inserciones en el terminal C del bucle pueden llevar a un movimiento de las posiciones N terminales de la inserción hacia el terminal N del bucle. Las eliminaciones en el terminal C del bucle pueden llevar a un movimiento de las posiciones N terminales de la eliminación hacia el terminal C del bucle. La selección del uso de una inserción o eliminación en el extremo del terminal N o del terminal C del bucle se basa en los aminoácidos localizados en el bucle, el deseo de afinidad incrementada o disminuida Fc/asociado de enlazamiento Fc, y el desplazamiento posicional deseado.

15 Las inserciones o eliminaciones pueden ser utilizadas en cualquier región de un polipéptido Fc, incluyendo los bucles, las regiones helicoidal alfa y de lámina beta. Las localizaciones preferidas para las inserciones y eliminaciones incluyen regiones de bucle, las cuales son aquellas que no son regiones helicoidales alfa o de lámina beta. Los bucles son preferidos porque generalmente aceptan alteraciones en el esqueleto mejor que las hélices alfa o las láminas beta. Las localizaciones particularmente preferidas para inserciones o eliminaciones que dan como resultado interacciones proteína/proteína más fuertes están en los bordes terminales N o terminales C de un bucle. Si las cadenas laterales del bucle están involucradas en las interacciones Fc/asociado de enlazamiento de Fc, entonces las inserciones o eliminaciones en los bordes llevarán menos probablemente a cambios no fuertemente nocivos en las interacciones de enlazamiento. Las eliminaciones dentro del centro exacto del bucle probablemente removerán más residuos importantes en la interfaz Fc/asociado de enlazamiento de Fc y las inserciones dentro del centro exacto del bucle más probablemente crearán interacciones desfavorables en la interfaz Fc/asociado de enlazamiento de Fc. El número de residuos eliminados e insertados puede ser determinado por el tamaño del cambio en el esqueleto deseado siendo preferida las inserciones o eliminaciones de 15 o menos residuos, siendo más preferida las inserciones o eliminaciones de 10 o menos residuos, y siendo las más preferidas las inserciones o eliminaciones de 5 o menos residuos.

30 Una vez que la posición y tamaño de una variante por eliminación de Fc está diseñada, la secuencia completa de polipéptido es determinada completamente y el polipéptido puede ser construido por métodos conocidos en la técnica.

35 Las variantes de inserción en Fc, sin embargo, tiene la etapa adicional de diseñar la secuencia de al menos un aminoácido que va a ser insertado. Las inserciones de residuos polares, incluyendo Ser, Thr, Asn, Gln, Ala, Gly, His, son preferidas en las posiciones que se espera estarán expuestas en el polipéptido Fc. Los aminoácidos más pequeños, incluyendo Ser, Thr y Ala, son particularmente preferidos puesto que el tamaño pequeño tiene menos probabilidades de interferir estéricamente con las interacciones Fc/asociado de enlazamiento de Fc. Ser y Thr tienen también la capacidad de formar puentes de hidrógeno con átomos sobre el asociado de enlazamiento de Fc.

40 Las inserciones tienen también la flexibilidad añadida de que el polipéptido insertado puede ser diseñado para hacer interacciones favorables con el asociado de enlazamiento de Fc como sería deseable cuando se desean enlazamientos más fuertes Fc/asociado de enlazamiento de Fc. La longitud de la inserción en el esqueleto puede ser determinada modelando el esqueleto variante con una secuencia genérica simple para ser insertada. Por ejemplo, pueden construirse y modelarse inserciones de poliserina, poliglicina y polialanina de diferentes longitudes. La modelación puede hacerse mediante una variedad de métodos, incluyendo modelación por homología con base en estructuras tridimensionales conocidas de homólogos que comprenden la inserción, o por modelación por ordenador incluyendo MODELLER (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) y ROSETTA (Kuhlman et al. (2003). Science 302, 1364-8).

45 Típicamente, se generan inicialmente diversas conformaciones de esqueleto y la estructura de esqueleto final puede ser determinada después de que se establecen las identidades de la cadena lateral. Las cadenas laterales pueden ser diseñadas por algoritmos PDA[®] (US 6,188,965; 6,269,312; 6,403,312; 6,801,861; 6,804,611; 6,792,356, 6,950,754, y USSN 09/782,004; 09/927,790; 10/101,499; 10/666,307; 10/666311; 10/218,102).

50 Las inserciones y eliminaciones pueden hacerse para alterar el enlazamiento de los polipéptidos de Fc a FcgammaR en una forma análoga al método descrito para alterar las propiedades de enlazamiento de FcRn. Los dominios de Fc se enlazan a FcgammaR en la posición indicada en la figura 1. Las estructuras del complejo Fc/FcgammaR, incluyendo los códigos PDB 1T89 y 1IIS (Radaev S et al. J. Biol. Chem. v276, p.16469-16477), demuestran los residuos que interactúan y los bucles en las dos estructuras. Los resultados de la mutagénesis tales como los encontrados en US11/124620 y US6737056) tienen todas utilidades en determinados desplazamiento apropiados del posicionamiento en el esqueleto.

Las inserciones y eliminaciones pueden ser diseñadas en un polipéptido además de los polipéptidos de Fc por los métodos descritos aquí. Por ejemplo, pueden diseñarse inserciones o eliminaciones en el miembro de la superfamilia TNF, APRIL, con la ayuda de su estructura tridimensional (código PDB 1XU1.pdb, Hymowitz, et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:7218). Las inserciones o eliminaciones pueden ser diseñadas para incrementar el enlazamiento APRIL a su receptor, TACI. Los residuos de bucle preferidos como sitios de inserción o eliminación son los residuos Ser118-Val124, Asp164-Phe167, Pro192-Ala198, Pro221-Lys226. Estos bucles interactúan con TACI en el complejo APRIL/TACI y median en el enlazamiento.

Polipéptidos que incorporan variantes

Las variantes de IgG pueden ser basadas en secuencias de IgG humanas, y estas secuencias de IgG humanas se utilizan como secuencias "base" contra las cuales se comparan otras secuencias incluyendo pero no limitándose a secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedores y primates. Las variantes de IgG también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulinas tales como IgA, IgE, IgD, IgM, y similares. Se contempla que, aunque las variantes de IgG sean manipuladas en el contexto de una IgG original, las variantes pueden ser manipuladas en/o "transferidas" al contexto de otra segunda IgG original. Esto se hace determinando los residuos "equivalentes" o "correspondientes" y las sustituciones entre la primera y la segunda IgG, típicamente con base en la homología de secuencia o estructural entre las secuencias de las IgG. Con el fin de establecer la homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG delineada aquí es comparada directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, utilizando uno o más de los programas de alineamiento de homología conocidos en el arte (por ejemplo utilizando residuos conservados como entre especies), permitiendo las inserciones y eliminaciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (esto es, evitando la eliminación de residuos conservados a través de eliminación e inserción arbitrarias), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de IgG. El alineamiento de residuos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de tales residuos sin embargo, el alineamiento de más de 75% o tan poco como 50% de residuos conservados también es adecuado para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también pueden ser definidos por la determinación de la homología estructural entre una primera y una segunda IgG que está al nivel de la estructura terciaria para las IgG cuyas estructuras han sido determinadas. En este caso, los residuos equivalentes son definidos como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácido principal del progenitor o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están dentro de 0.13 nm y preferiblemente 0.1 nm después del alineamiento. Se alcanza el alineamiento después de que el mejor modelo ha sido orientado y posicionado para dar la máxima superposición de coordenadas atómicas de átomos de proteína que no son hidrógeno de las proteínas. Independientemente de que tan equivalente o correspondientes sean determinados los residuos, e independientemente de la identidad de la IgG progenitora en la cual se hacen las IgG, lo que se busca es estar seguros de que las variantes de IgG descubiertas puedan ser manipuladas en una segunda IgG progenitora que tenga homología de secuencia estructural significativa con la variante de IgG. Así por ejemplo, si un anticuerpo variante es generado en donde el anticuerpo progenitor es IgG1 humana, al utilizar los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede ser manipulado en otro anticuerpo progenitor de IgG que se enlaza a un antígeno diferente, un anticuerpo progenitor humano IgG2, un anticuerpo progenitor humano IgA, un anticuerpo progenitor de ratón IgG2a o IgG2b, y similares. De nuevo, como se describió más arriba, el contexto de la variante de IgG progenitora no afecta la capacidad de transferir las variantes de IgG a otras IgG progenitoras.

Se proveen métodos para manipular, producir y seleccionar variantes de IgG. Los métodos descritos no pretenden restringir ninguna aplicación o teoría de aplicación en particular. En vez de esto, los métodos provistos pretenden ilustrar en general que una o más variantes de IgG pueden ser manipuladas, producidas y seleccionadas experimentalmente para obtener variantes de IgG con función efectora optimizada. Se describe una variedad de métodos para diseñar, producir y probar variantes de anticuerpos y proteínas en USSN 10/754,296, y USSN 10/672,280.

Una variedad de métodos de manipulación de proteínas pueden ser utilizados para diseñar variantes de IgG con función efectora optimizada. En una realización, puede utilizarse un método de manipulación basado en estructura, en donde se utiliza información estructural disponible para guiar la sustitución, inserciones o eliminaciones. En una realización preferida, puede usarse un método de selección computacional, en donde se diseñan sustituciones con base en su rendimiento energético en cálculos computacionales. Véase, por ejemplo, USSN 10/754,296, y USSN 10/672,280, y referencias citadas allí.

Puede utilizarse un alineamiento de secuencias para guiar las sustituciones en posiciones identificadas. Una persona experimentada en la técnica apreciará que el uso de información de secuencias puede inducir la introducción de sustituciones que son potencialmente nocivas para la estructura proteínica. La fuente de las secuencias puede variar ampliamente, e incluir una o más de las bases de datos conocidas, incluyendo pero no limitándose a la base de datos Kabat (Northwestern University); Johnson & Wu, 2001, Nucleic Acids Res. 29:205-206; Johnson & Wu, 2000, Nucleic Acids Res. 28:214-218), the IMGT database (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc et al., 1999,

Nucleic Acids Res. 27:209-212; Ruiz et al., 2000 Nucleic Acids Res. 28:219-221; Lefranc et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29:207-209; Lefranc et al., 2003, Nucleic Acids Res. 31:307-310), y VBASE. La información de secuencias de anticuerpos puede ser obtenida, compilada y/o generada a partir de alineamientos de secuencias de secuencias de línea germinal o secuencias de anticuerpos de origen natural a partir de cualquier organismo, incluyendo pero no limitándose a mamíferos. Una persona experimentada en la técnica apreciará que el uso de secuencias que son humanas o sustancialmente humanas puede tener adicionalmente la ventaja de ser menos inmunogénica que cuando se administra a un humano. Otras bases de datos que son bases de datos más generales de ácidos nucleicos o proteínas, esto es, no son particulares para anticuerpos, incluyen pero que no están limitadas a SwissProt, GenBank Entrez, y EMBL Nucleotide Sequence Database. Las secuencias alineadas pueden incluir secuencias VH, VL, CH, y/o CL. Hay numerosos programas y métodos de alineamiento basados en secuencias conocidas en la técnica, y todos estos encuentran en uso en la generación de alineamientos de secuencia.

Alternativamente, los métodos de mutagénesis aleatoria o semialeatoria pueden ser utilizados para hacer modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas. En estos casos las posiciones son escogidas aleatoriamente, o los cambios de aminoácidos se hacen utilizando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pueden ser mutados a alanina, lo que se denomina barrido con alanina. Tales métodos pueden ser acoplados con metodología de manipulación más sofisticada que emplean métodos de selección para niveles de selección más altos de diversidad de secuencias. Como es bien conocido en la técnica, hay una variedad de técnicas de selección que pueden ser utilizadas para tales metodologías, incluyendo, por ejemplo, tecnologías de despliegue tales como despliegue de fagos, despliegues de ribosomas, despliegues de superficie celular y similares, como se describe más adelante.

Los métodos para la producción y selección de variantes de IgG son bien conocidos en la técnica. Los métodos generales para la biología, expresión, purificación y selección molecular de anticuerpos están descritos en Antibody Engineering, editado por Duebel & Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; and Hayhurst & Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5:683-689; Maynard & Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2:339-76. También véanse los métodos descritos en USSN 10/754,296; USSN 10/672,280; y USSN 10/822,231; y 11/124,620. Variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 8. Variantes alternativamente preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 9. Adicionalmente variantes alternativamente preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 10. Estas variantes han mostrado un enlazamiento incrementado al receptor de Fc, FcRn, como se ilustra en los ejemplos.

Preparación de variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden ser hechas por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, las secuencias de variantes de IgG se utilizan para crear ácido nucleicos que codifican la secuencias miembro, y que pueden ser clonadas en células anfitrionas, expresadas y ensayadas, si se desea. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos, y una variedad de métodos que pueden encontrar uso están descritos en Molecular Cloning – A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de IgG pueden ser incorporados en un vector de expresión con el fin de expresar la proteína. Los vectores de expresión incluyen típicamente una proteína enlazada operativamente, esto es, colocada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier asociado de fusión y/o elementos adicionales. Las variantes de IgG pueden ser producidas por cultivo de una célula anfitriona transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene el ácido nucleico que codifica las variantes de IgG, bajo las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Puede utilizarse una amplia variedad de células anfitrionas apropiadas, incluyendo pero no limitándose a células de mamíferos, bacterias, células de insectos, y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar usos están descritas en el catálogo de líneas celulares ATCC, disponible de la American Type Culture Collection. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células anfitrionas son bien conocidos en la técnica, y variaran con la célula anfitriona usada.

En una realización preferida, se purifican o aíslan variantes de IgG después de la expresión. Los anticuerpos pueden ser aislados o purificados en una variedad de formas conocidas para los experimentados en la técnica. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, electroforéticas, inmunológicas de precipitación, diálisis, filtración, concentración y técnicas de cromatoenfoco. Como es bien conocida en la técnica, una variedad de proteínas naturales se enlazan a anticuerpos, por ejemplo, las proteínas bacterianas A, G y L, y estas proteínas pueden encontrar uso en purificación. Frecuentemente, la purificación puede ser permitida mediante un asociado de fusión particular. Por ejemplo, las proteínas pueden ser purificadas utilizando resinas de glutationa si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad en Ni²⁺ si se emplea una etiqueta de His, o con un anticuerpo anti-bandera inmovilizado si se utiliza una etiqueta de bandera. Para guía general en técnicas de purificación adecuadas, véase Antibody Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994.

Selección de variantes de IgG

Las variantes de Fc pueden ser seleccionadas utilizando una variedad de métodos, incluyendo pero no limitándose a aquellos que usan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y técnicas de selección. Las tecnologías de selección con automatización y alto rendimiento pueden ser utilizadas en los procedimientos de selección. La selección puede emplear el uso de un asociado de fusión o etiqueta o marcador, por ejemplo, un marcador inmune, un marcador isotópico, un marcador de molécula pequeña, tal como un colorante fluorescente o colorimétrico.

Las propiedades funcionales y/o biofísicas de las variantes de Fc son seleccionadas en un ensayo *in vitro*. La proteína es seleccionada en cuanto a su funcionalidad por ejemplo su capacidad para catalizar una reacción o su afinidad de enlazamiento a su objetivo.

Como es bien sabido en la técnica, subconjuntos de métodos de selección son aquellos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se denominan aquí como "métodos de selección", y estos métodos encuentran uso en la presente invención para seleccionar variantes de Fc. Cuando se seleccionan bibliotecas de proteínas utilizando un método de selección, solo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, esto es que satisfacen algunos criterios de selección, son propagados, aislados y/o observados. Una variedad de métodos de selección son conocidos en la técnica y pueden encontrar uso en la presente invención para la selección de bibliotecas de proteínas. Otros métodos de selección que pueden encontrar uso en la presente invención incluyen métodos que no se basan en despliegue, tales como métodos *in vivo*. Un subconjunto de métodos de selección denominados como métodos de "evolución dirigida" son aquellos que incluyen la comparación o cruzamiento de secuencias favorables durante la selección, algunas veces con la incorporación de nuevas mutaciones.

Las variantes de Fc pueden ser seleccionadas utilizando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para tales ensayos, las proteínas purificadas o no purificadas son agregadas típicamente de manera exógena de tal manera que las células son expuestas a variantes individuales o conjuntos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos están basados típicamente, pero no siempre, en la función del polipéptido de Fc; esto es, inhibición del enlazamiento ligando/receptor, apoptosis, y similares. Tales ensayos involucran frecuentemente la monitorización de la respuesta de las células a la IgG, por ejemplo, la supervivencia de las células, muerte de las células, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o de un gen informador. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de Fc para obtener ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos, puede ser necesario agregar células o componentes adicionales, esto es, además de las células objetivo, por ejemplo, complemento de suero, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, y similares. Tales células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los anticuerpos pueden producir la apoptosis de ciertas líneas celulares que expresan el objetivo, o pueden mediar el ataque sobre células objetivo por parte de células inmunes que han sido agregadas al ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte o la viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radioactivos. La activación transcripcional también puede servir como método para ensayar la función en pruebas basadas en células. Alternativamente, las selecciones basadas en células se llevan a cabo utilizando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Esto es, las variantes de Fc no son agregadas exógenamente a las células.

Las propiedades biológicas de las variantes de IgG pueden ser caracterizadas en experimentos en células, tejidos y el organismo completo. Como es sabido en la técnica, los fármacos se prueban frecuentemente en animales, incluyendo pero no limitándose a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, con el fin de medir la eficacia del fármaco para un tratamiento contra una enfermedad o un modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades del fármaco. Los animales pueden ser considerados como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos son probados frecuentemente en ratones, incluyendo pero no limitándose a ratones lampiños, ratones SCID, ratones con xenoinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo incorporaciones y anulaciones). Tal experimentación puede proveer datos significativos para la determinación del potencial de la proteína para ser usada como un agente terapéutico. Cualquier organismo, preferiblemente mamíferos, puede ser utilizado para la prueba. Por ejemplo debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y así pueden ser utilizados para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otras propiedades de las IgG. Las pruebas en los humanos se requieren finalmente para la aprobación como fármacos, y así desde luego se contemplan estos experimentos. Así, las IgG pueden ser probadas en humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética y/ o otras propiedades clínicas.

Métodos para la utilización de variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden encontrar uso en un amplio rango de productos. En una realización la variante de IgG es un agente terapéutico, un agente de diagnóstico, o un reactivo de investigación, preferiblemente un agente terapéutico. La

variante de IgG puede encontrar uso en una composición de anticuerpos que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, las variantes de IgG se utilizan para matar células objetivo que portan el antígeno objetivo, por ejemplo células de cáncer. En una realización alternativa, las variantes de IgG se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno objetivo, por ejemplo, para antagonizar una citoquina o un receptor de citoquina. En una realización preferida
5
alternativamente, las variantes de IgG se utilizan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno objetivo y matar las células objetivo que portan el antígeno objetivo.

Las variantes de IgG pueden ser utilizadas para diversos propósitos terapéuticos. En una realización preferida, un anticuerpo que comprende la variante de IgG es administrado a un paciente para tratar un trastorno relacionado con el anticuerpo. Un "paciente" para los propósitos presentes incluye humanos u otros animales, preferiblemente mamíferos, y los más preferiblemente humanos. Por "trastorno relacionado con un anticuerpo" o "trastorno que responde a un anticuerpo" o "condición" o "enfermedad" aquí significan un trastorno que puede ser mejorado por la administración de una composición farmacéutica que comprende una variante de IgG. Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen pero no se limitan a enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. Por "cáncer" y "canceroso" se hace referencia aquí o se describe la condición fisiológica en mamíferos que es caracterizada típicamente por crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia y enfermedades malignas linfoides.
10
15

En una realización, una variante de IgG es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, la variante de IgG es administrada en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos, incluyendo pero no limitándose a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. Las variantes de IgG pueden ser administradas concomitantemente con uno o más otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante de IgG puede ser administrada al paciente junto con quimioterapia, terapia por radiación, o terapia tanto de quimioterapia como radiación. En una realización, la variante de IgG puede ser administrada en conjunción con uno o más anticuerpos, los cuales pueden o pueden no estar en una variante de IgG. De acuerdo con otra realización, la variante de IgG y una o más terapias anticáncer se emplean para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que tal tratamiento *ex vivo* puede ser útil en trasplante de médula ósea y particularmente, trasplante de médula ósea autólogo. Desde luego se contempla que las variantes de IgG pueden ser empleadas en combinación con todavía otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.
20
25
30

Una variedad de otros agentes terapéuticos pueden encontrar uso para la administración con las variantes de IgG. En una realización, la IgG se administra con un agente antiangiogénico. Por "agente antiangiogénico" tal como se utiliza aquí se entiende un compuesto que bloquea, o interfiere hasta cierto grado, con el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, una fusión de Fc, o citoquina, que se enlaza a un factor de crecimiento o a un receptor de un factor de crecimiento involucrado en la promoción de la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferido aquí es un anticuerpo que se enlaza al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una realización alternativa, la IgG es administrada con el agente terapéutico que induce o potencia la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que apunte a CTLA-4. En una realización alternativa, la IgG es administrada con un inhibidor de la tirosina quinasa. Por "inhibidor de la tirosina quinasa" tal como se utiliza aquí se entiende una molécula que inhibe hasta cierto grado la actividad de la tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, las variantes de IgG son administradas con una citoquina.
35
40

Se contemplan composiciones farmacéuticas en donde se formulan una variante de IgG y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de IgG se preparan para almacenamiento mezclado la IgG que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980, incorporados completamente como referencia), en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Las formulaciones que se van a utilizar para administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril u otros métodos. Las variantes de IgG y otros agentes terapéuticamente activos divulgados aquí también pueden ser formulados como inmunoliposomas, y/o atrapados en microcápsulas.
45

La concentración de la variante de IgG terapéuticamente activa en la formulación puede variar desde aproximadamente 0.1 a 100% en peso. En una realización preferida la concentración de la IgG está en el rango 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 IgG. Por "dosis terapéuticamente efectiva" aquí se entiende una dosis que produce los efectos para los cuales es administrada. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será posible establecerla por parte de una persona experimentada en el arte utilizando técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar desde 0.01 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0.01, 0.1, 1.0, 10, o 50 mg/kg de peso corporal, siendo preferido 1 a 10 mg/kg. Como es conocido en el arte, los
50
55

ajustes para la degradación de proteína, administración sistémica versus localizada, y rata de síntesis de nuevas proteasas, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción con fármacos y la severidad de la condición pueden ser necesarios, y serán fáciles de establecer con experimentación de rutina por parte de los experimentados en el arte.

5 La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante de IgG, preferiblemente en la forma de una solución acuosa estéril, puede ser hecha en una variedad de formas, incluyendo, pero no limitándose a oral, subcutánea, intravenosa, parenteral, intranasal, intraaórtica, intraocular, rectal, vaginal, transdérmica, por vía tópica (por ejemplo geles, unguentos, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, tecnología inhalable AERx[®] disponible comercialmente de Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance[®] disponible de Nektar Therapeutics, etc.). Los agentes terapéuticos descritos aquí pueden ser administrados con otros agentes terapéuticos de manera concomitante, esto es, los agentes terapéuticos descritos aquí pueden ser coadministrados con otras terapias o agentes terapéuticos, incluyendo por ejemplo, moléculas pequeñas, otros agentes biológicos, terapia de radiación, cirugía, etc.

Ejemplos

15 Se proveen a continuación ejemplos para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden restringir la presente invención en ninguna aplicación o teoría de operación en particular. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración va de acuerdo con el index EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Los experimentados en la técnica de los anticuerpos apreciarán que esta convención consiste de una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, permitiendo una referencia normalizada para posiciones conservadas en las familias de inmunoglobulinas. De acuerdo con lo anterior, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada tal como se define en el índice EU no necesariamente corresponderán a su secuencia secuencial.

Ejemplo 1: Construcción de ADN, expresión y purificación de variantes de Fc

25 Las modificaciones de aminoácidos fueron manipuladas en la región de Fc de anticuerpos IgG para mejorar su afinidad por el receptor de Fc neonatal FcRn. Las variantes fueron seleccionadas en el contexto de un número de diferentes cadenas constantes de IgG humanas (Figura 2), incluyendo IgG1, IgG2 y unas secuencias de IgG híbridas que contienen las regiones CH1 y la bisagra superior de IgG1 y la región Fc de IgG2. Será evidente para los experimentados en la técnica que debido a las diferentes interacciones de las regiones IgG1 e IgG2 con FcγRs y complementarias, estas diferentes regiones Fc originales tienen diferentes propiedades de función efectora FcγR y mediada por complementos. Secuencias de ejemplos de variantes de Fc en el contexto de estas cadenas constantes de IgG original se muestran en la Figura 3.

30 Las variantes de Fc fueron manipuladas en el contexto de un anticuerpo que apunta al factor endotelial vascular (VEGF). Las regiones variables de cadena pesada y liviana (VH y VL) son la de una versión humanizada del anticuerpo A4.6.1, también denominada como bevacizumab (Avastin[®]), el cual está aprobado para el tratamiento de una variedad de cánceres. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de este anticuerpo se muestran en la Figura 4.

35 Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos anti-VEGF fueron construidas en el vector de expresión pTT5 de mamífero. Los genes de la cadena constante humana IgG1 e IgG2 fueron obtenidos a partir de clones IMAGE y subclonados en el vector pTT5. El gen IgG1/2 fue construido utilizando mutagénesis por PCR. Los genes de VH y VL que codifican los anticuerpos anti-VEGF fueron sintetizados comercialmente (Blue Heron Biotechnologies, Bothell WA), y subclonados en los vectores codificando las cadenas constantes CL, IgG1, IgG2, e IgG1/2 apropiadas. Las modificaciones de aminoácidos fueron construidas bajo mutagénesis dirigida al sitio utilizando los métodos de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange[®] (Stratagene, La Jolla CA). Todos los ADN fueron secuenciados para confirmar la fidelidad de las secuencias.

40 Los plásmidos que contenían el gen de cadena pesada (VH-Cy1-Cy2-Cy3) fueron cotransfectados con plásmidos que contenían el gen de cadena liviana (VL-Cκ) en células 293E utilizando lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad CA) y cultivados en medio FreeStyle 293 (Invitrogen, Carlsbad CA). Después de 5 días de crecimiento, los anticuerpos fueron purificados a partir del sobrenadante del cultivo mediante afinidad de proteína A utilizando la resina MabSelect (GE Healthcare). Las concentraciones de anticuerpos fueron determinadas con el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce).

Ejemplo 2. Anticuerpos variantes de Fc que mantienen enlazamiento a antígeno

45 La fidelidad de los anticuerpos variantes expresados fue confirmada demostrando que mantenían especificidad al antígeno. El enlazamiento a VEGF fue monitorizado utilizando resonancia de plasmón en superficie (SPR, Biacore), ejecutando usando un instrumento Biacore 3000. El VEGF recombinante (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ) fue adherido a la superficie de un chip CM5 acoplado con N-hidroxisuccinimida/N-etil-N'-(-3-dimetilamino-propil) carbodiimida (NHS/EDC)

utilizando métodos estándar. Los anticuerpos WT y variantes fueron inyectados como analitos, y la respuesta, fue anotada medida en unidades de resonancia (RU). La fase de disociación fue demasiado lenta para medir las constantes de equilibrio verdaderas, de tal manera que se determinó el enlazamiento relativo midiendo las RU al final de la fase de asociación, lo cual sería proporcional a la concentración de proteína (la cual se mantiene constante en el experimento) y la rata de asociación constante. Los datos (figura 6) muestran que los anticuerpos anti-VEGF variantes mantienen enlazamiento al antígeno, en contraste con el control negativo del anticuerpo anti-Her2 el cual no se enlaza a VEGF.

Ejemplo 3. Medición del enlazamiento a FcRn humana

El enlazamiento de anticuerpos variantes a FcRn humana fue medido a pH 6.0, el pH al cual se enlaza de manera natural en los endosomas. Los vectores que codifican la beta 2 microglobulina y los genes de cadena alfa etiquetados con His de FcRn fueron construidos, cotransfectados en células 293T y purificados utilizando cromatografía con níquel. La afinidad del anticuerpo por FcRn (hFcRn) humana a pH 6.0 se midió en un instrumento Biacore 3000 acoplado FcRn humana a la superficie de un chip CM5 utilizando química NHS/EDC estándar. Los anticuerpos WT y variantes fueron utilizados en la fase móvil a concentración de 25-100 nM y la respuesta fue medida en unidades de resonancia. Se tomaron las fases de asociación y desasociación a pH 6.0, seguidas por una inyección de un regulador de pH 7.4 para medir la liberación del anticuerpo del receptor a un pH más alto. Un ciclo con anticuerpo regulador solamente proveyó una respuesta de línea base, la cual fue sustraída de cada sensorgrama de la muestra.

La Figura 7 muestra sensorgramas Biacore para enlazamiento de IgG1 natural y anticuerpos variantes Fc seleccionados a FcRn humana a los dos pH relevantes. Los datos muestran que los anticuerpos tipo silvestre y variantes se enlazan fácilmente al chip FcRn a pH 6.0 y se disocian lentamente a ese pH, como lo harían en el endosoma, si bien se liberan rápidamente a pH 7.4, como lo harían al reciclar del endosoma a la membrana y exponer a un pH más alto del suero.

Las curvas de asociación/disociación de FcRn no se ajustan a un modelo Langmuir simple, posiblemente debido a la multivalencia del anticuerpo y del receptor o a la heterogeneidad del chip. Los valores de pseudo-Ka (denominado como Ka*) fueron determinados ajustando un modelo de cambio conformacional con el cambio en el índice de refracción (RI) fijado a 0 RU. Estos valores para anticuerpos variantes seleccionados se representan gráficamente en la Figura 8. La afinidad relativa de cada variante comparada con su IgG original fue calculada de acuerdo con la ecuación $\text{Repeticiones} = (\text{WT Ka}^* / \text{Variante Ka}^*)$. Los datos de enlazamiento relativos para todas las variantes de Fc en una región IgG1 Fc se presentan en la Figura 9, y los datos de enlazamiento para variantes en anticuerpos con una región IgG2 Fc (cadenas constantes IgG1 e IgG1/2) se presentan en la Figura 10. Para muchas variantes, el experimento de enlazamiento fue repetido múltiples veces (n), para las cuales se calcularon las repeticiones con referencia al IgG WT original dentro de cada experimento de enlazamiento particular. El promedio de estos datos proveyó una media y una desviación estándar, como se presenta en las Figuras 9 y 10.

Las Figuras 9 y 10 muestran un número de variantes manipuladas que se enlazan con gran afinidad a FcRn enlazándose a pH 6.0 con respecto a WT IgG1. Las mejoras fueron fundamentalmente dependientes de la identidad de la sustitución en una posición dada. Por ejemplo, utilizando 2 repeticiones como criterio para enlazamiento mejorado, un cierto número de mutaciones en la posición 434 en IgG2 incrementó la afinidad (A, S, Y, F, y W), algunas veces fueron neutrales (2 repeticiones de WT IgG2), (G, H, M, y T) y un número de sustituciones redujo la afinidad (< 0.5 repeticiones) (D, E, K, P, R, y V). El enlazamiento mayor en el contexto de IgG1 no necesariamente se tradujo en un enlazamiento superior en IgG2 (por ejemplo se mejoró 434T en enlazamiento en IgG1 pero no en IgG2). Además, las mejoras provistas por las variantes simples no siempre fueron aditivos por combinación. La figura 11a demuestra esto gráficamente representando el enlazamiento a repeticiones de FcRn experimental por variantes de sustitución doble seleccionadas versus el producto de enlazamiento a repeticiones de FcRn por las variantes individuales que los componen. La línea recta representa la actividad perfecta, esto es, el valor que sería esperado o predicho a partir del producto de las sustituciones individuales. Un número de variantes dobles caen cercanos a esta línea (259I/319I, 259I/428L, 319I/428L, y 308F/428L). Varias variantes son menos que aditivas (319I/308F, 252Y/428L, y 428L/434M). Para estas variantes, particularmente en el caso de las últimas dos (252Y/428L y 428L/434M), las mejoras en afinidad de las sustituciones individuales parecerían ser incompatibles una con otra cuando se combinan. Sorprendentemente, las mejoras de afinidad por FcRn de las variantes 259I/308F y 428U/434S fueron mayores de lo esperado a partir de las afinidades de sus respectivas sustituciones individuales. Esas sustituciones individuales particulares tienen mejoras sinérgicas inesperadas cuando se combinan. La diferencia entre las afinidades experimentales y las predichas a partir de las afinidades de las variantes individuales están representadas en la Figura 11b, con variantes agrupadas de acuerdo con sus variantes individuales compuestas (259I, 308F, y 319I en la izquierda, y las combinaciones con 428L a la derecha). La sinergia puede ser cuantificada calculando las repeticiones del valor experimental con respecto al valor predicho, seguido por la normalización a 1 y conversión a un porcentaje (% de sinergia = $100 \times [(\text{repeticiones experimentales}/\text{repeticiones predichas}) - 1]$). Este análisis está representado en la Figura 11b, con variantes agrupadas de acuerdo con sus variantes individuales compuestas. Esta gráfica resalta de nuevo la sinergia de alguna de las variantes, particularmente 259I/308F y 428U/434S. Las Figuras 11b y 11c también enfatizan la naturaleza no predictiva de la combinación de muchas de las mejores sustituciones individuales a partir de la selección. Por ejemplo, mientras que la

combinación de 428L con 434S y 259I proveyó mejoras de enlazamiento sinérgicas, 252Y y 434M tuvieron un impacto negativo cuando se combinaron con 428L. La diferencia dramática entre la combinación de 428L con 434S versus 434M resalta adicionalmente la importancia de la identidad de aminoácidos particular de la sustitución en una posición dada.

Ejemplo 4. Pruebas de variantes en otros contextos de anticuerpos

5 Los variantes seleccionados fueron construidos en el contexto de anticuerpos que apuntan hacia otros antígenos, incluyendo TNF (TNF- α), CD25 (TAC), EGFR, e IgE. La Figura 4 provee las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de anticuerpos que apuntan a estos antígenos que fueron utilizados en la invención. Los anticuerpos de WT y variantes de Fc anti-TNF contienen la región variable del anticuerpo completamente humano adalimumab (Humira[®]), aprobado
10 actualmente para el tratamiento de artritis reumatoide (RA), artritis idiopática juvenil (JIA), artritis psoriática (PsA), espondilitis anquilosante (AS), y enfermedad de Crohn (CD). Los anticuerpos de WT y variantes de Fc anti-CD25 son versiones humanizadas del anticuerpo anti-TAC (Junghans et al., 1990, Cancer Research 50:1495-1502), referido como anti-TAC H1.8/L1. Los anticuerpos de WT y variantes de Fc anti-EGFR son versiones humanizadas del anticuerpo murínico C225, denominado como C225 H4.42/L3.32. Finalmente, los anticuerpos de WT y variantes de Fc anti-IgE contienen la
15 región variable del anticuerpo humanizado omalizumab (Xolair[®]), el cual está aprobado para el tratamiento de asma alérgica.

Se construyeron, expresaron y purificaron anticuerpos de WT y variantes como se describe anteriormente. Los anticuerpos fueron probados en cuanto a su enlazamiento a FcRn humana a pH 6.0 por Biacore tal como se describió más arriba. Los datos de enlazamiento relativos de los anticuerpos anti-TNF, -CD25, -EGFR e -IgE variantes a FcRn humana están provistos en la figura 12. Como puede verse, las variantes mejoran la afinidad por FcRn en el contexto de los anticuerpos que apuntan a una variedad de antígenos.
20

Ejemplo 5. Experimentos farmacocinéticos en ratones con activación de FcRn humana

Para probar la habilidad de variantes selectas para mejorar la vida media *in vivo*, se llevaron a cabo experimentos farmacocinéticos en ratones B6 que son homocigóticos anulados para FcRn de murina y son heterocigóticos activados para FcRn humana (mFcRn^{-/-}, hFcRn^{+/+}) (Petkova et al., 2006, Int Immunol 18(12):1759-69), denominados aquí como ratones hFcRn o hFcRn⁺. Una inyección única intravenosa en la vena de la cola del anticuerpo anti-VEGF (2 mg/kg) fue dada a grupos de 4-7 ratones hembra aleatorizados por peso corporal (rango de 20-30 g). Se extrajo sangre (~50 ul) del plexo orbital en cada punto del tiempo, se procesó hasta obtener el suero, y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Las duraciones del estudio fueron de 28 a 49 días. Los animales no fueron maltratados durante estos estudios.
25

Las concentraciones de anticuerpos fueron determinadas utilizando dos ensayos ELISA. Los primeros dos estudios (denominados como Estudio 1 y Estudio 2), se adhirió anticuerpo de Fc de cabra antihumano (Jackson Immuno research) a la placa, los pozos fueron lavados con PBST (solución salina de fosfato con 0.05% de Tween) y bloqueados con BSA al 3% en PBST. Los estándares de suero o calibración fueron agregados entonces, seguidos por lavado con PBST, adición de IgG antihumana marcada con europio (Perkin Elmer), y lavado posterior con PBST. Se recolectó la señal de fluorescencia resuelta con el tiempo. Para los Estudios 3-5, la concentración en suero fue detectada utilizando un ELISA similar, pero se utilizó VEGF recombinante (VEGF-165, PeproTech, Rocky Hill, NJ) como reactivo de captura y la detección se llevó a cabo con anticuerpo kappa antihumano biotinilado y estreptavidina marcada con europio. Los parámetros PK fueron determinados para ratones individuales con un modelo no compartimental utilizando WinNonLin (Pharsight Inc, Mountain View CA). Se utilizaron tiempos y dosis nominales con pesaje uniforme de puntos. Los puntos en el tiempo utilizados (rangos lambda Z) fueron de 4 días hasta el final del estudio, aunque todos los puntos de tiempo fueron utilizados para eliminación más rápida de mutantes, P257N y P257L.
30
35
40

Se llevaron a cabo cinco estudios de anticuerpo PK en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn^{+/+}. La Figura 13 muestra los datos de concentración en suero para los anticuerpos de WT e IgG1 (Estudio 3) e IgG2 (Estudio 5) variantes respectivamente. Los parámetros PK ajustados para todos los estudios de PK *in vivo* llevados a cabo con ratones mFcRn^{-/-} hFcRn^{+/+} se proveen en la Figura 14. Los datos de PK incluyen vida media, la cual representa la fase beta que caracteriza la eliminación del anticuerpo a partir del suero, C_{máx}, la cual representa la concentración máxima observada en suero, AUC, la cual representa el área bajo la curva concentración tiempo, y eliminación, que representa la eliminación del anticuerpo desde el suero. También se provee para cada variante la mejora o reducción en repeticiones calculada en vida media con respecto al anticuerpo original IgG1 o IgG2 [repeticiones vida media = vida media (variante) / vida media (WT)].
45

Los datos muestran un cierto número de los anticuerpos de variantes Fc manipulados con afinidad potenciada por FcRn a pH 6.0 con vida media extendida *in vivo*. La Figura 15a muestra una gráfica de vida media *in vivo* versus enlazamiento a repeticiones de FcRn para los anticuerpos IgG1, con variantes seleccionadas marcadas. Los resultados de experimentos repetidos (encerrados en un círculo en la Figura) indican que los datos a partir del modelo *in vivo* son reproducibles. Las mejores variantes individuales incluyen 308F y 434S, las mejores variantes dobles incluyen 259I/308F, 308F/428L,
50

308F/434S, y 428L/434S, y la mejor variante triple es 259I/308F/428L. Hay una correlación general entre la afinidad para FcRn y vida media *in vivo*, pero no es completamente predictiva. De manera notable, las variantes 257L y 257N, las cuales mejoraron el enlazamiento a FcRn en 3.4 y 3.5 repeticiones respectivamente, redujeron la vida media *in vivo* en 0.6 y 0.3 respectivamente. La gráfica también resalta de nuevo la importancia de la identidad de los aminoácidos de sustitución en una posición dada –mientras que 308F/434S proveyeron una mejora sustancial en vida media, 308F/434M fue apenas mejor que WT IgG1.

La Figura 15b muestra una gráfica de la vida media *in vivo* versus las repeticiones de enlazamiento a FcRn para los anticuerpos variantes de IgG2 con las variantes marcadas. Cuando los datos *in vivo* de IgG2 fueron comparados con los datos *in vivo* de IgG1 (Figura 15c), se observó un resultado sorprendente. Las variantes proveyeron una mejora sustancialmente mayor a la vida media *in vivo* en el contexto de una región de Fc de IgG2 que lo que hicieron con una región Fc de IgG1. Las vidas medias más largas de la variante individual y de la variante doble de todos los anticuerpos en los 5 estudios fueron 12.2 y 16.5, provistas por 434S IgG2 y 428L/434S IgG2, respectivamente. La mejora dramática en las vidas medias para las variantes IgG2 con respecto a IgG1 fueron a pesar del hecho de que las mejoras en veces por las variantes en IgG2 fueron comparables o incluso inferiores a las que fueron en IgG1 (434S IgG1 repeticiones = 3.8, 434S IgG2 repeticiones = 4.9, 428L/434S IgG1 repeticiones = 17.3, 428L/434S IgG2 repeticiones = 14.8). Así inesperadamente, el anticuerpo de IgG2 puede ser la mejor aplicación para las variantes de Fc para mejorar la vida media *in vivo* en mamíferos.

Ejemplo 6. Inmunoadhesinas variantes

Las variantes de Fc de la invención también son evaluadas por su capacidad para mejorar la vida media de las inmunoadhesinas (también denominadas como fusiones de Fc). Se manipularon variantes de Fc seleccionadas en un etanercepto de inmuno adhesión anti-TNF (Enbrel®). El etanercepto es una fusión de un receptor 2 TNF humano (TNF RII) y la región Fc de IgG1 humana, y está aprobado clínicamente para el tratamiento de artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, artritis psoriática y psoriasis. Una versión de la región Fc de IgG2 también fue construida, y también se construyeron variantes de Fc seleccionadas en este contexto. Las secuencias de aminoácidos de las inmunoadhesinas anti-TNF caracterizadas en la invención se proveen en la Figura 16. Los genes fueron construidos utilizando PCR recursivo y subclonados en el vector pTT5, y las variantes de Fc fueron construidas utilizando métodos de mutagénesis QuikChange®. Las inmunoadhesinas fueron expresadas en células 293E y purificadas como se describió más arriba.

La especificidad de enlazamiento de la inmunoadhesinas purificadas fue confirmada por la prueba del enlazamiento a TNF recombinante por Biacore. Las inmunoadhesinas fueron capturadas sobre un chip biosensor CM5 de Proteína A/G (Pierce) y movilizadas, (Biacore), generados utilizando acoplamiento de aminos primarias estándar. Las inmunoadhesinas fueron inmovilizadas sobre la superficie de la Proteína A/G, y se inyectó TNF recombinante en diluciones seriadas sobre la superficie de enlazamiento del anticuerpo, seguido por una fase de disociación. Después de cada ciclo, la superficie fue regenerada con regulador. Los datos fueron procesados definiendo un tiempo y respuesta cero antes de la inyección del receptor y sustrayéndolo de un canal de referencia para contar los cambios debidos a las inyecciones. Los datos cinéticos fueron ajustados a un modelo de enlazamiento 1:1 (Langmuir). Las constantes de asociación de equilibrio (Ka) obtenidas de estos ajustes se proveen en la Figura 17. Los resultados muestran que las inmunoadhesinas variantes retiene la afinidad por TNF, en comparación con el Enbrel comercial.

Las inmunoadhesinas variantes fueron probadas en cuanto al enlazamiento a FcRn humana a pH 6.0 utilizando Biacore como se describió más arriba. Los resultados (Figura 18) indican que, de la misma forma que en el contexto de los anticuerpos, las variantes mejoran el enlazamiento a FcRn con respecto a sus proteínas de inmuno adhesina originales IgG1 e IgG2.

Las vidas medias de las inmunoadhesinas variantes fueron probadas en los ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺ tal como se describió más arriba. Se inyectaron 12 ratones por grupo a 2 mg/kg de variante e inmuno adhesina IgG1 original. La concentración en suero fue detectada utilizando un ELISA similar al descrito anteriormente, excepto que el anticuerpo TNF RII antihumano de cabra fue utilizado como reactivo de captura. Se llevó a cabo la detección con anticuerpo kappa antihumano biotinilado y estreptavidina marcada con europio. La Figura 19 muestra los datos de concentración en suero para las inmuno adhesinas de WT IgG1 Fc y Fc variante. Los parámetros de PK ajustados, tal como se describió anteriormente, a partir del estudio de PK se proveen en la Figura 20. También se provee para cada variante el porcentaje de incremento calculado en vida media, calculado como 100 veces la vida media de la fusión Fc variante con respecto a la de la WT IgG1 Fc original. Los resultados indican que las variantes extienden la vida media *in vivo* en el contexto de la inmuno adhesina.

Ejemplo 7. Experimento de farmacocinética en primates no humanos.

Las propiedades de PK en estudios biológicos con primates no humanos son bien establecidas como predictivas de sus propiedades en humanos. Un estudio de PK fue llevado a cabo en monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) con el fin de evaluar la capacidad de los anticuerpos variantes anti-VEGF para mejorar la vida media en suero en primates no humanos.

5 En preparación para un estudio de PK en monos cynomolgus, fue medido el enlazamiento de anticuerpos variantes a FcRn de cynomolgus (cino) (cFcRn) a pH 6.0. El cFcRn fue construido, expresado y purificado como se describió más arriba para FcRn humana. El enlazamiento de anticuerpos anti-VEGF variantes a cFcRn medido utilizando Biacore como se describió más arriba. Los datos se proveen en la Figura 21. Los resultados muestran que las variantes mejoran la afinidad para cino FcRn de la misma manera que lo hace para FcRn humana. La disociación al pH más alto (7.4) también fue muy rápida (datos no mostrados), de la misma forma que la observada para el enlazamiento a FcRn humana. Estos resultados no son sorprendentes dada la alta homología de secuencia de los receptores humano y cino (cadena alfa FcRn 96%, beta-2-microglobulina 91%).

10 El PK de las variantes fue estudiado en primates no humanos *in vivo*. Monos cynomolgus macho (*Macaca fascicularis*, también denominados Macacos comedores de cangrejos) que pesaban 2.3-5.1 kg fueron aleatorizados por peso y divididos en 5 grupos con 3 monos por grupo. A los monos se dio una infusión individual, en vena periférica durante 1 hora de 4 mg/kg de anticuerpo. Se tomaron muestras de sangre (1 ml) de una vena separada durante 5 minutos a 90 días después de la terminación de la infusión, se procesaron hasta obtener el suero y se almacenaron a -70°C. Los animales no fueron puestos en riesgo durante estos estudios.

15 Las concentraciones de anticuerpos fueron determinadas utilizando el método de captura de VEGF como se describió más arriba. Se determinaron los parámetros PK ajustando las concentraciones versus tiempo en un modelo no compartimental tal como se hizo para los estudios de PK en ratón. Sin embargo, se usaron puntos de tiempo desde día 10 a día 90 para las determinaciones de parámetros PK. Los resultados de PK se representan en la Figura 22, y los parámetros ajustados se proveen en la Figura 23. Los resultados muestra que las variantes potenciaron la vida media *in vivo* del anticuerpo hasta 3.2 repeticiones. En el mejor caso (la variante 428U434S) la vida media fue extendida desde 9.7 días a 31.1 días. Los resultados de PK obtenidos en monos cynomolgus son consistentes con los obtenidos en ratones mFcRn^{-/-} hFcRn⁺, validando el modelo de ratón hFcRn como un sistema para establecer las propiedades PK *in vivo* de las variantes, y apoyando las conclusiones de esos estudios.

Listados de secuencias

<110> XENCOR, INC.

LAZAR, GREGORY

30 CHAMBERLAIN, AARON KEITH

DAHIYAT, BASSIL I.

DESJARLAIS, JOHN R.

KARKI, SHER BAHADUR

<120> Variantes de inmunoglobulinas que mejoran la vida media *in vivo*

35 <130> 5026-US03

<150> 61/ 031,353

<151> 2008-02-25

<150> 61/016,793

<151> 2007-12-26

40 <150> 61/046,353

<151> 2008-04-18

<150> 61/050,172

<151> 2008-05-02

<150> 61/079,779

<151> 2008-07-10

<150> 61/099,178

5 <151> 2008-09-22

<160> 35

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

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

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

15

85

90

95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 2

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 532 461 T3

	195		200		205														
Lys	Ala 210	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 215	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 220	Lys	Ala	Lys	Gly				
Gln 225	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 230	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 235	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 240				
Met	Thr	Lys	Asn	Gln 245	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 250	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 255	Tyr				
Pro	Ser	Asp	Ile 260	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 265	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro 270	Glu	Asn				
Asn	Tyr	Lys 275	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 280	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 285	Ser	Phe	Phe				
Leu	Tyr 290	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 295	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 300	Gln	Gln	Gly	Asn				
Val 305	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 310	Met	His	Glu	Ala	Leu 315	His	Asn	His	Tyr	Thr 320				
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 325	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 330										

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 532 461 T3

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

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

ES 2 532 461 T3

					85						90						95
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro		
			100					105					110				
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp		
		115					120					125					
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp		
	130					135					140						
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly		
145					150					155					160		
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		
				245					250					255			
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr		
			260					265					270				
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys		
		275					280					285					
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys		
	290					295					300						
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu		
305					310					315					320		
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys												
				325													

<210> 4

<211> 377

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 4

ES 2 532 461 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
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 Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

ES 2 532 461 T3

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335

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> 5

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 532 461 T3

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

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

ES 2 532 461 T3

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
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 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
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 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
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 6

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada constante IgG1/2 (CH1-bisagra-CH2-CH3))

<400> 6

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG1 259I/308F

<400> 7

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

<210> 8

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> IgG1 434S/428L

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 532 461 T3

	195		200		205												
Lys	Ala 210	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile 215	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser 220	Lys	Ala	Lys	Gly		
Gln 225	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln 230	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro 235	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu 240		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln 245	Val	Ser	Leu	Thr	Cys 250	Leu	Val	Lys	Gly	Phe 255	Tyr		
Pro	Ser	Asp	Ile 260	Ala	Val	Glu	Trp	Glu 265	Ser	Asn	Gly	Gln 270	Pro	Glu	Asn		
Asn	Tyr	Lys 275	Thr	Thr	Pro	Pro	Val 280	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly 285	Ser	Phe	Phe		
Leu	Tyr 290	Ser	Lys	Leu	Thr	Val 295	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp 300	Gln	Gln	Gly	Asn		
Val 305	Phe	Ser	Cys	Ser	Val 310	Leu	His	Glu	Ala	Leu 315	His	Ser	His	Tyr	Thr 320		
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser 325	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys 330								

<210> 9

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG2 434S

<400> 9

ES 2 532 461 T3

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

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

ES 2 532 461 T3

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 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
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

<210> 10

<211> 326

<212> PRT

ES 2 532 461 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG2 434S/428L

<400> 10

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

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 Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 532 461 T3

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
245 250 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300
Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 11

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> IgG1/2 434S

<400> 11

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

ES 2 532 461 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 115 120 125
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 130 135 140
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 145 150 155 160
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 165 170 175
 Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
 180 185 190
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 195 200 205
 Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 210 215 220
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 225 230 235 240
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 245 250 255
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 260 265 270
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 275 280 285
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 290 295 300
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
 305 310 315 320
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 12

<211> 329

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> IgG1/2 434S/428L

<400> 12

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His
180 185 190

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-VEGF VH

<400> 13

ES 2 532 461 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-VEGF VL

<400> 14

ES 2 532 461 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-TNF VH

<400> 15

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

ES 2 532 461 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-TNF VL

<400> 16

ES 2 532 461 T3

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD25

<400> 17

ES 2 532 461 T3

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-CD25 VL

<400> 18

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

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

ES 2 532 461 T3

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

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

Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Arg Ser Thr Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-EGFR VH

<400> 19

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Thr Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Val Leu
 65 70 75 80
 Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 20

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-EGFR VL

<400> 20

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Asn
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 21

<211> 121

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-IgE VH

<400> 21

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

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

Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Val Ala Ser Ile Thr Tyr Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Val
 50 55 60

ES 2 532 461 T3

Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Phe Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His Trp His Phe Ala Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-IgE VL

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp
20 25 30

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Tyr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

10 <210> 23

<211> 214

<212> PRT

ES 2 532 461 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena liviana Anti-TNF

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 24

5

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cadena pesada IgG1 259I/308F Anti-TNF

<400> 24

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 25

<211> 451

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada IgG1 434S/428L Anti-TNF

<400> 25

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 26

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena pesada IgG2 434S Anti-TNF

<400> 26

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

<220>

<223> Cadena pesada IgG2 434S/428L Anti-TNF

<400> 27

ES 2 532 461 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys
 210 215 220
 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
 290 300

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

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

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
 385 390 395 400

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

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 28

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 532 461 T3

<223> Cadena pesada de IgG1/2 434S Anti-TNF

<400> 28

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

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 29

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 532 461 T3

<223> Cadena pesada IgG1/2 434S/428L Anti-TNF

<400> 29

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

ES 2 532 461 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

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

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His
 420 425 430 435

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

Gly Lys
 450

<210> 30

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusión con IgG1 Fc

<400> 30

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485

<210> 31

<211> 488

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Anti-TNF Fc fusión con IgG2 Fc

<400> 31

ES 2 532 461 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
145 150 155 160

Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
165 170 175

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
180 185 190

Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
195 200 205

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 385 390 395 400
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 405 410 415
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 420 425 430
 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 435 440 445
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 450 455 460
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 465 470 475 480
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

485

<211> 489

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Anti-TNF Fc fusión con IgG1 259I/308F Fc

<400> 32

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

ES 2 532 461 T3

Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220

Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240

Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255

Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Ile Thr Cys Val
 290 295 300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Phe Leu His
 340 345 350

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 385 390 395 400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 420 425 430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 435 440 445

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

ES 2 532 461 T3

450

455

460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 33

<211> 489

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusión con IgG1 428L/434S Fc

<400> 33

ES 2 532 461 T3

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

ES 2 532 461 T3

Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 275 280 285
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 290 295 300
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 305 310 315 320
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 325 330 335
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 340 345 350
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 355 360 365
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 370 375 380
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 385 390 395 400
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 405 410 415
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

ES 2 532 461 T3

420

425

430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435 440 445

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450 455 460

Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala Leu His Ser His Tyr Thr Gln
465 470 475 480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 34

<211> 488

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Anti-TNF Fc fusión con IgG2 434S Fc

<400> 34

ES 2 532 461 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
100 105 110

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
115 120 125

Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
130 135 140

ES 2 532 461 T3

Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 355 360 365
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 370 375 380
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

ES 2 532 461 T3

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
 1 5 10 15

Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
 20 25 30

Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
 35 40 45

Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
 50 55 60

Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
 65 70 75 80

Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
 85 90 95

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
 100 105 110

ES 2 532 461 T3

Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
 115 120 125
 Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
 130 135 140
 Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
 145 150 155 160
 Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
 165 170 175
 Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
 180 185 190
 Asn Ala Ser Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
 195 200 205
 Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
 210 215 220
 Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
 245 250 255
 Asp Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 260 265 270
 Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 275 280 285
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 290 295 300
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 305 310 315 320
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 325 330 335
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 340 345 350
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly

ES 2 532 461 T3

	355					360					365				
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro
	370					375					380				
Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr
385					390					395					400
Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser
				405					410						415
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr
			420					425					430		
Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
		435					440					445			
Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe
	450					455					460				
Ser	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Ala	Leu	His	Ser	His	Tyr	Thr	Gln	Lys
465					470					475					480
Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				485											

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que comprende dos modificaciones con respecto a una región Fc humana tipo silvestre, en donde dichas modificaciones son 428L y 434S, en donde dicho anticuerpo tiene una vida media más larga en un mamífero en comparación con un anticuerpo sin dichas modificaciones, y en donde la numeración está de acuerdo con el índice EU en Kabat et al., para uso como medicamento.
2. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha región Fc es seleccionada del grupo consistente de: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.
3. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo comprende una región IgG1 Fc.
4. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo comprende una región IgG2 Fc.
- 10 5. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es para el tratamiento de un trastorno de un humano.
6. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo tiene especificidad para un antígeno seleccionado del grupo consistente de: Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), CD25, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e IgE.
- 15 7. Un anticuerpo para uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el medicamento es para el tratamiento de un trastorno seleccionado de enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas.
8. Un anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el trastorno es cáncer.

Figura 1

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	G	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	G
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	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG2	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG3	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y
IgG4	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	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	G	T	Q	T	Y	I	C	N
IgG2	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	N	F	G	T	Q	T	Y	T	C	N
IgG3	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	T	C	N
IgG4	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	K	T	Y	T	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	R	V	E	P	K	S	C
IgG2	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	T	V	E	R	K	C	C	
IgG3	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	L	K	T	P	
IgG4	V	D	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	R	V	E	S	K	Y	G	

Bisagra										Fc >												
Índice EU	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236						
IgG1	D			K	T	H	T	C	P	P												
IgG2				V		E		C	P	P												
IgG3	L	G	D	T	T	H	T	C	P	R	C	P	E	P	K	S	C	D	T	P	P	
IgG4						P	P	C	P	S												

Índice EU	229	230	231	232	233	234	235	236					
IgG1	C	P	A	P	E	L	L	G					
IgG2	C	P	A	P	P	V	A						
IgG3	E	P	K	S	C	D	T	P	P	P	C	P	R
IgG4	C	P	A	P	E	F	L	G					

Figura 1 (continuación)

CH2		237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	
Índice EU		237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	
IgG1		G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
IgG2		G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
IgG3		G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	
IgG4		G	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	Q	F	N	W	Y	
IgG3		E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q	F	K	W	Y	
IgG4		E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q	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	Q	Y	N	S	T	
IgG2		V	D	G	V	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	N	S	T
IgG3		V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	
IgG4		V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	F	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	G	K	E	Y	K	
IgG2		F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
IgG3		F	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	
IgG4		Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	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	T	K		
IgG3		C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K		
IgG4		C	K	V	S	N	K	Q	L	P	S	S	I	E	K	T	I	S	K	A	K		
CH3																							
Índice EU		341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	
IgG1		G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D/E	E	LM	T	K	N	
IgG2		G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	
IgG3		G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	
IgG4		G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	Q	E	E	M	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		Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
IgG2		Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
IgG3		Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	
IgG4		Q	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	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	
IgG2		S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S	
IgG3		S	S	G	Q	P	E	N	N	Y	N	T	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S	
IgG4		S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	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	Q	N	V	F	S	
IgG2		F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	Q	N	V	F	S	
IgG3		F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	Q	N	I	F	S	
IgG4		F	F	L	Y	S	R	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	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/G	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	R	F	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	L	
Índice EU		446	447																				
IgG1		O	K																				
IgG2		O	K																				
IgG3		O	K																				
IgG4		O	K																				

Figura 2

Cadena ligera constante Kappa (Ck) (SEQ ID NO: 1)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada constante IgG1 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:2)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKS
LSLSPGK

Cadena pesada constante IgG2 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:3)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Cadena pesada constante IgG3 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:4)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPGLDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRC
PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYN
TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Cadena pesada constante IgG4 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:5)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSL
SLGK

Cadena pesada constante IgG1/2 (CH1-bisagra-CH2-CH3) (SEQ ID NO:6)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQD
WLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLS
LSLSPGK

Figura 3

IgG1 259I/308F (SEQ ID NO:7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLFQH
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYQKSL
SLSPGK

IgG1 434S/428L (SEQ ID NO:8)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYQKSL
SLSPGK

IgG2 434S (SEQ ID NO:9)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYQKSLSL
SPGK

IgG2 434S/428L (SEQ ID NO:10)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYQKSLSL
SPGK

IgG1/2 434S (SEQ ID NO:11)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQ
WLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYQKSL
SLSPGK

IgG1/2 434S/428L (SEQ ID NO:12)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQ
WLNQKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYQKSL
SLSPGK

Figura 4

Anti-VEGF VH (SEQ ID NO:13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVWGWINTYTGPTYAA
DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGLTVTVSS

Anti-VEGF VL (SEQ ID NO:14)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQQKPKGKAPKVLIIYFTSSLSHSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYSTVPWTFGQGTKVEIK

Anti-TNF VH (SEQ ID NO:15)

EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADS
VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS

Anti-TNF VL (SEQ ID NO:16)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNYLAWYQQKPKGKAPKLLIIAASTLQSGVPSRFSGS
GSGTDFLTISLQPEDVATYYCQRYNRPYTFGQGTKVEIK

Anti-CD25 VH (SEQ ID NO:17)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYRMHWVRQAPGQGLEWMMGWINPSTGYTEYNQ
KFQGRVTITADKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARGGGVFDYWGQGLTVTVSS

Anti-CD25 VL (SEQ ID NO:18)

QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSISYMHWFQKPKQSPQLLIYTTNLSASGVPARFSGSG
SGTDYTLTISLQPEDFAVYYCHQRSTYPLTFGSGTKLEIK

Anti-EGFR VH (SEQ ID NO:19)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLCTVSGFSLSNYGVHWVRQAPGKGLEWMMGIWSSGSTDYSTSL
KSRLTISKDTSKQVLTMTNMDPVDATYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSS

Anti-EGFR VL (SEQ ID NO:20)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSNLHWYQQKPKDQSPKLLIKYASESISGVPARFSGSG
SGTDFLTISLQAEDVAVYYCQNNNWPTTFGQGTKLEIK

Anti-IgE VH (SEQ ID NO:21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGYSITSGYSWNWIRQAPGKGLEWVASITYDGSTNYNPSV
KGRITISRDDSKNTFYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSHYFGHWHFAVWGQGLTVTVSS

Anti-IgE VL (SEQ ID NO:22)

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVDDYDGSYMNWYQQKPKGKAPKLLIIAASYLESVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSHEDPYTFGQGTKVEIK

Figura 5

Cadena ligera Anti-TNF (SEQ ID NO: 23)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIIRNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSGS
 GSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
 VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada IgG1 259I/308F Anti-TNF (SEQ ID NO: 24)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK

Cadena pesada IgG1 434SI/428L Anti-TNF (SEQ ID NO: 25)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKLSLSLSPGK

Cadena pesada IgG2 434S Anti-TNF (SEQ ID NO:26)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKLSLSLSPGK

Cadena pesada IgG2 434SI/428L Anti-TNF (SEQ ID NO:27)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
 VTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC
 KVSNNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
 PENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKLSLSLSPGK

Cadena Pesada IgG1/2 434S Anti-TNF (SEQ ID NO:28)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
 SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR
 TPEITCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEY
 KCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKLSLSLSPGK

Figura 5 (continuación)

Cadena pesada IgG1/2 434S/428L Anti-TNF (SEQ ID NO:29)

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWWRQAPGKGLEWWSAITWNSGHIDYADS
 VEGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP
 SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
 PEVTCVWVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVWSVLTVHVDWLNKEY
 KCKVSNKGLPAPIEKTSKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFVLSLWYLSKLSLSPGK

Figura 6

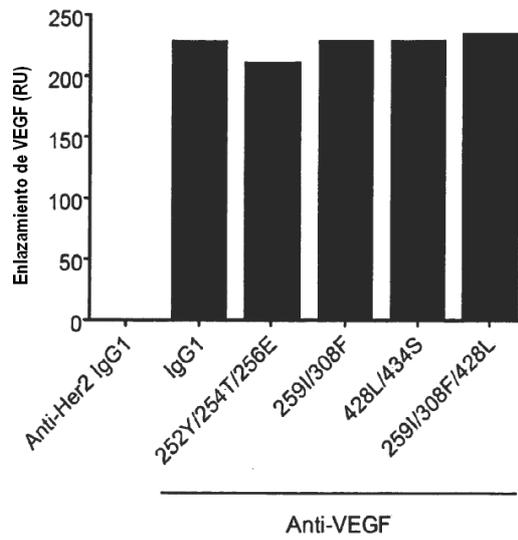


Figura 7

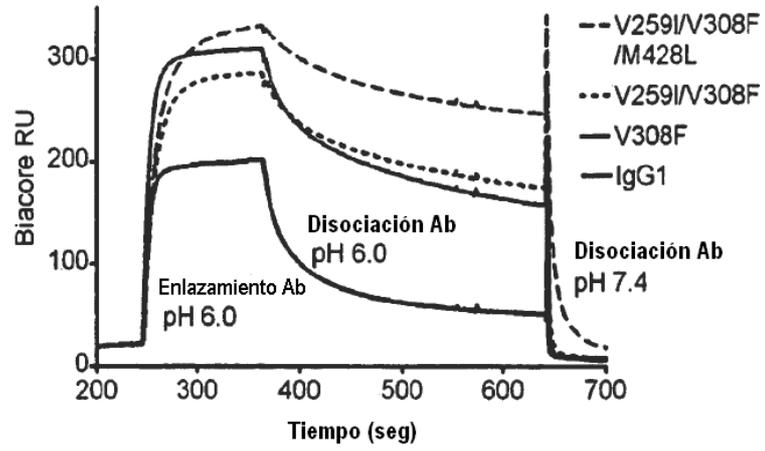


Figura 8

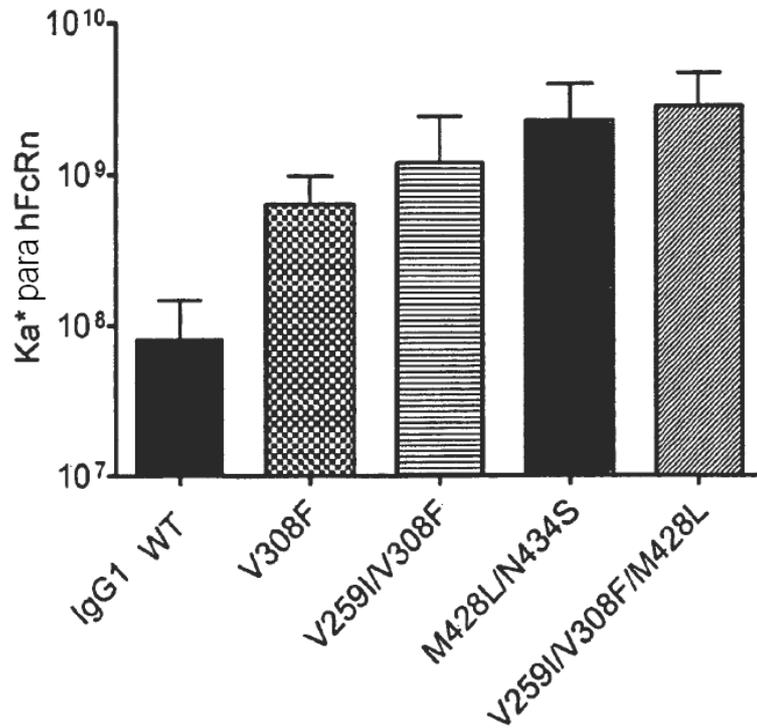


Figure 9

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-VEGF		1.00	
T250I	IgG1	Anti-VEGF	1	1.31	
M252Q	IgG1	Anti-VEGF	5	2.36	3.07
M252Y	IgG1	Anti-VEGF	2	4.82	0.62
M252E	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252P	IgG1	Anti-VEGF	1	0.03	
M252R	IgG1	Anti-VEGF	1	0.02	
M252D	IgG1	Anti-VEGF	1	NB	
M252K	IgG1	Anti-VEGF	1	0.64	
R255Y	IgG1	Anti-VEGF	1	1.24	
P257L	IgG1	Anti-VEGF	1	3.39	
P257N	IgG1	Anti-VEGF	1	3.53	
V259I	IgG1	Anti-VEGF	2	1.14	0.19
V259F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.44	
V259G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259H	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.68	
V259N	IgG1	Anti-VEGF	1	1.87	
V259S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259W	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V259Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
T307N	IgG1	Anti-VEGF	1	0.83	
T307G	IgG1	Anti-VEGF	1	1.72	
V308F	IgG1	Anti-VEGF	6	4.96	1.06
Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	1.43	
Y319I	IgG1	Anti-VEGF	2	1.48	0.53
Y319A	IgG1	Anti-VEGF	1	2.66	
Y319G	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319H	IgG1	Anti-VEGF	1	1.81	
Y319M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.95	
Y319N	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319Q	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319S	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319T	IgG1	Anti-VEGF		ND	
Y319V	IgG1	Anti-VEGF	1	2.03	

Figura 9 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
Y319W	IgG1	Anti-VEGF	1	1.51	
E380A	IgG1	Anti-VEGF		ND	
E380Q	IgG1	Anti-VEGF	1	2.01	
E380R	IgG1	Anti-VEGF	1	3.41	
E380S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.55	
E380V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	3.00	0.37
N434A	IgG1	Anti-VEGF	4	2.15	0.54
N434S	IgG1	Anti-VEGF	6	3.77	0.79
N434M	IgG1	Anti-VEGF	3	4.83	1.23
N434T	IgG1	Anti-VEGF	1	3.32	
N434V	IgG1	Anti-VEGF		ND	
N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
P245G/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	2.89	
T250I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	6.75	0.10
T250Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	3	6.30	0.82
M252Y/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
M252Q/V259I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.14	
M252Q/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	0.43	
M252Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	1.04	
M252Y/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.63	0.32
M252Q/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	0.21	
M252Y/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	0.35	
M252Y/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	5.32	
M252Y/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.94	
M252Y/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	11.46	2.73
M252Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.20	
M252Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.48	
M252Y/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.79	
M252Y/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	61.60	
S254T/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.56	
T256V/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.04	1.94
T256E/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	35.53	
V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	12	9.79	2.72
V259A/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.81	
V259L/V308F	IgG1	Anti-VEGF		ND	

Figura 9 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
V259I/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	2.00	
V259I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.53	
V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	5.67	
V259I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	0.87	
V259I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	24.81	
L306I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	7.92	
T307P/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.17	
T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	5.57	0.69
T307S/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	5.22	
T307Q/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	7.25	
T307Q/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	14.18	
T307Q/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.99	
T307Q/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	50.43	
V308F/L309Y	IgG1	Anti-VEGF	1	5.37	
V308F/L309N	IgG1	Anti-VEGF	1	1.00	
V308F/Q311P	IgG1	Anti-VEGF		ND	
V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	2	5.84	0.30
V308F/Y319F	IgG1	Anti-VEGF	1	3.10	
V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	4	13.71	2.13
V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	2	4.20	0.78
V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14.63	0.28
V308F/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	41.55	
Q311A/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	27.42	
Y319I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	3	4.93	0.82
Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.70	
Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	4.22	
Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4.42	
Y319I/N434Y	IgG1	Anti-VEGF		ND	
M428L/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	12.74	
M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	14	17.28	6.70
M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	1.88	
M428L/N434Y	IgG1	Anti-VEGF	1	39.54	
N434S/Y436F	IgG1	Anti-VEGF	1	4.43	
N434S/Y436M	IgG1	Anti-VEGF	1	2.58	
T250I/V259I/V308F	IgG1	Anti-VEGF	1	11.29	
T250Q/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	17.08	
T250I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12.26	

Figura 9 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-VEGF	10	11.37	2.90
M252Q/V259I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	0.65	
M252Y/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10.62	
M252Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	2.37	
M252Y/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	11.09	
M252Y/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	12.13	
M252Q/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	1.90	
V259I/T307Q/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	7.40	1.54
V259I/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	3.53	
V259I/V308F/Y319I	IgG1	Anti-VEGF	1	4.10	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-VEGF	13	19.94	10.46
V259I/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	3	10.86	3.38
V259I/V308F/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	7.06	
V259I/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7.90	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	9.57	
V259I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	11.91	
T307Q/V308F/Y319L	IgG1	Anti-VEGF	1	4.24	
T307Q/V308F/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	4.04	
V308F/Y319I/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	10.20	
V308F/Y319L/M428L	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/Y319L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	12.39	5.63
V308F/Y319I/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3.78	
V308F/Y319I/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	NF	
V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	5	16.68	4.89
V308F/M428L/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	8.14	
Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	13.90	
M252Y/S254T/T256E/N434A	IgG1	Anti-VEGF	1	11.37	
M252Y/S254T/T256E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	10.29	2.99
M252Y/S254T/T256E/V308F	IgG1	Anti-VEGF	2	9.84	4.04
M252Y/S254T/T256E/M428L	IgG1	Anti-VEGF	2	11.43	6.01
M252Y/S254T/T256E/T307Q	IgG1	Anti-VEGF	1	13.50	
M252Y/S254T/T256E/N434M	IgG1	Anti-VEGF	1	3.62	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	24.22	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	2	14.23	0.75
V308F/Y319I/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	10.37	
M252Y/S254T/T256E/M428L/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	7.21	

Figura 10

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG2	Anti-VEGF		1.00	
V259I	IgG2	Anti-VEGF	1	1.02	
V308F	IgG2	Anti-VEGF	2	3.66	2.07
M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	4.19	
N434A	IgG2	Anti-VEGF	1	3.83	
N434S	IgG2	Anti-VEGF	2	4.88	1.05
N434G	IgG2	Anti-VEGF	1	1.60	
N434H	IgG2	Anti-VEGF	1	1.45	
N434M	IgG2	Anti-VEGF	1	1.51	
N434T	IgG2	Anti-VEGF	1	1.22	
N434Y	IgG2	Anti-VEGF	1	21.39	
N434D	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434E	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434F	IgG2	Anti-VEGF	1	16.79	
N434K	IgG2	Anti-VEGF	1	NB	
N434P	IgG2	Anti-VEGF	1	0.26	
N434R	IgG2	Anti-VEGF	1	0.44	
N434V	IgG2	Anti-VEGF	1	0.48	
N434W	IgG2	Anti-VEGF	1	39.81	
T250Q/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	7.62	
V259I/V308F	IgG2	Anti-VEGF	1	6.58	
V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	16.13	
V308F/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	16.36	
M428L/N434S	IgG2	Anti-VEGF	1	14.80	
M252Y/S254T/T256E	IgG2	Anti-VEGF	1	8.34	
V259I/V308F/M428L	IgG2	Anti-VEGF	1	15.29	

Figura 10 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1/2	Anti-VEGF		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.28	
L251A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.65	
L251F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.95	
L251I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.28	
L251M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.83	
L251N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.34	
L251V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.31	
R255H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.23	
R255Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.53	
T307I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.09	
T307V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.25	
Q311A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.35	
Q311D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.39	
Q311E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.94	
Q311F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.95	
Q311G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.26	
Q311I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	15.81	
Q311K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.57	
Q311L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.00	
Q311M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.12	
Q311N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.27	
Q311P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.56	
Q311R/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.96	
Q311T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.17	
Q311V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	14.17	
Q311W/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.97	
Q311Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.65	
L314F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.35	
L314I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.54	
L314M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.05	
L314Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.75	
L314V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.34	
H429N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.78	
H429V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.69	
E430A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.24	
E430D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.79	

Figura 10 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
E430F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.79	
E430I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.27	
E430L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.40	
E430Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.20	
E430S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.58	
E430T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.37	
A431F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.21	
A431G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.31	
A431H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.29	
A431N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.06	
A431S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.18	
A431T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.46	
A431V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.64	
L432A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.83	
L432F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.14	
L432G/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.71	
L432H/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.69	
L432I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.96	
L432N/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.43	
L432Q/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.59	
L432V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.24	
H433A/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.41	
H433D/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.75	
H433E/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.73	
H433F/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.76	
H433I/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.94	
H433K/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.65	
H433L/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.14	
H433M/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.91	
H433P/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.33	
H433S/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	3.68	
H433T/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.88	
H433V/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.41	
H433Y/N434S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.56	
N434S/Y436A	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.03	
N434S/Y436D	IgG1/2	Anti-VEGF	1	1.79	
N434S/Y436E	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.36	

Figura 10 (continuación)

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
N434S/Y436G	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.24	
N434S/Y436H	IgG1/2	Anti-VEGF	1	7.63	
N434S/Y436I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	30.57	
N434S/Y436K	IgG1/2	Anti-VEGF	1	9.00	
N434S/Y436L	IgG1/2	Anti-VEGF	1	12.81	
N434S/Y436N	IgG1/2	Anti-VEGF	1	0.39	
N434S/Y436Q	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.14	
N434S/Y436R	IgG1/2	Anti-VEGF	1	5.60	
N434S/Y436S	IgG1/2	Anti-VEGF	1	6.67	
N434S/Y436T	IgG1/2	Anti-VEGF	1	4.71	
N434S/Y436V	IgG1/2	Anti-VEGF	1	17.46	
N434S/Y436W	IgG1/2	Anti-VEGF	1	19.47	
N434S/T437I	IgG1/2	Anti-VEGF	1	2.96	
G236R/L328R	IgG1	Anti-VEGF	1	1.25	
V308F/I332E	IgG1	Anti-VEGF	1	4.15	
I332E/N434S	IgG1	Anti-VEGF	1	3.91	
G236A/V308F/I332E	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	1.82	
G236A/I332E/N434S	IgG1/2 ELLG 327A	Anti-VEGF	1	3.87	

Figura 11a

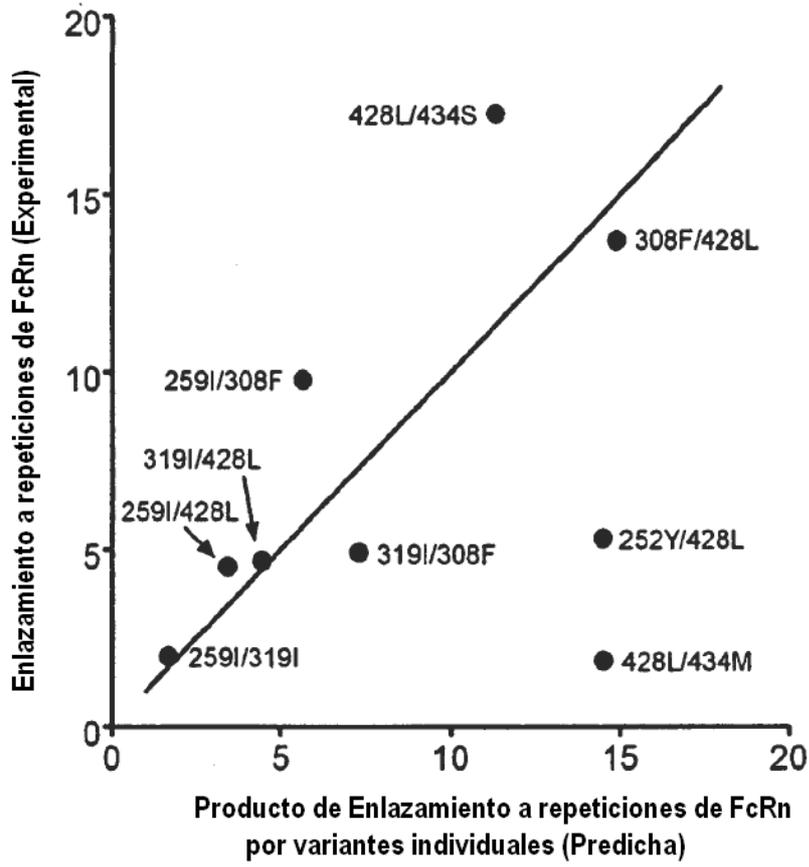


Figura 11b

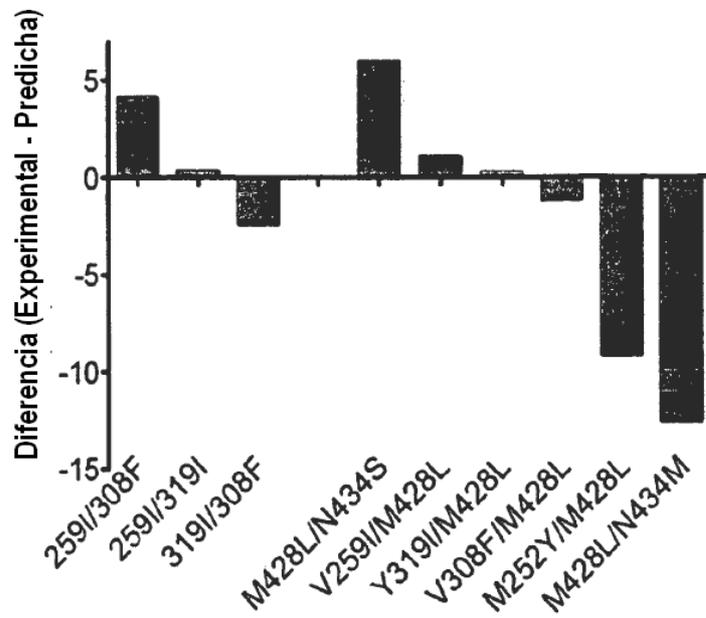


Figura 11c

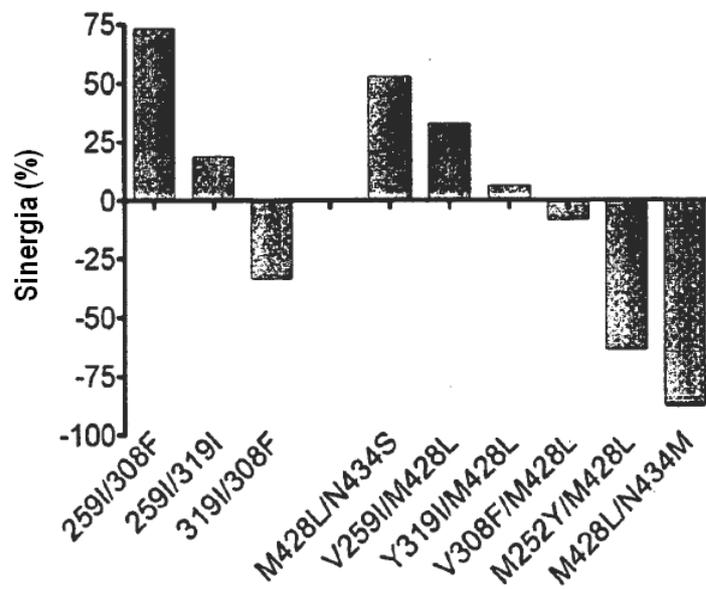


Figura 12a

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-TNF		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-TNF	3	13.25	5.09
M428L/N434S	IgG1	Anti-TNF	2	19.76	4.42
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-TNF	2	49.85	5.09
G236R/L328R	IgG1	Anti-TNF	1	0.99	
WT	IgG2	Anti-TNF		1.00	
N434S	IgG2	Anti-TNF	2	3.12	0.79
M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	3	19.99	8.69
L328R	IgG2	Anti-TNF	1	0.97	
L328R/M428L/N434S	IgG2	Anti-TNF	1	19.67	
WT	IgG1/2	Anti-TNF		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-TNF	2	7.22	0.16
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	3	25.39	5.13
L328R	IgG1/2	Anti-TNF	1	1.87	
L328R/M428L/N434S	IgG1/2	Anti-TNF	1	39.90	

Figura 12b

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-CD25		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-CD25	1	3.49	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-CD25	1	19.97	
WT	IgG1/2	Anti-CD25		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	5.16	
M428L/N434S	IgG1/2	Anti-CD25	1	28.00	

Figura 12c

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-EGFR		1.00	
V259I/V308F	IgG1	Anti-EGFR	3	14.23	8.51
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-EGFR	2	32.96	20.16
WT	IgG1/2	Anti-EGFR		1.00	
N434S	IgG1/2	Anti-EGFR	1	1.61	
N434S/M428L	IgG1/2	Anti-EGFR	1	5.93	

Figura 12d

Variante	IgG	Fv	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	Anti-IgE		1.00	
M428L	IgG1	Anti-IgE	1	3.06	
N434S	IgG1	Anti-IgE	1	4.38	
V259I/V308F	IgG1	Anti-IgE	1	8.34	
V308F/Y319I	IgG1	Anti-IgE	1	5.39	
V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	14.25	
M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	12.63	
M252Y/S254T/T256E	IgG1	Anti-IgE	1	9.56	
V259I/V308F/M428L	IgG1	Anti-IgE	1	20.27	
V259I/V308F/M428L/N434S	IgG1	Anti-IgE	1	27.29	

Figura 13a

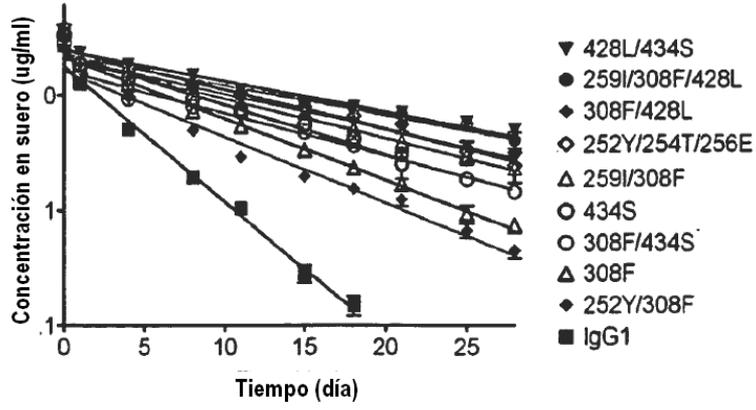


Figura 13b

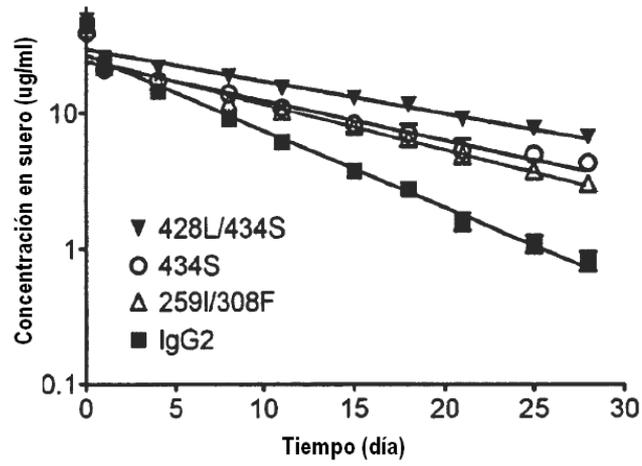


Figura 14

Variante de Fc	IgG	n	Vida media			C _{máx}		AUC		Eliminación	
			(día)			(ug/mL)		(día*ug/mL)		(mL/día/kg)	
			Media	SD	Repeti- ciones	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Estudio 1											
WT (IgG1 Nativo)	IgG1	6	3	0.5	1.0	28.5	7.3	69.8	8.4	29.1	4.2
P257L	IgG1	6	1.9	0.4	0.6	18.1	8.4	38	11.3	59.5	28.8
P257N	IgG1	6	0.9	0.1	0.3	30.1	4.7	38.2	6.1	53.4	8.8
V308F	IgG1	6	4.9	0.3	1.6	30.1	9.4	129.2	11	15.6	1.3
T250Q/M428L	IgG1	6	8.4	2.8	2.8	22.3	3.8	186	52.5	12	5.4
M252Y/S254T/T256E	IgG1	4	10.9	1.2	3.6	34.6	10.1	330.8	57.3	6.2	1.1
N434A	IgG1	6	5.5	2.1	1.8	24.5	6.2	143.1	26.9	14.3	2.2
Estudio 2											
WT (IgG1 Nativo)	IgG1	7	3.9	0.52	1.0	36	5.6	92	13	22	2.9
V308F	IgG1	7	6.8	0.99	1.7	28	8.7	152	34.6	14	3.4
M252T/S254T/T256E	IgG1	7	11.3	1.2	2.9	25	7	241	64.2	8.9	2.6
Estudio 3											
WT (IgG1 Nativo)	IgG1	6	2.8	0.3	1.0	27	6	69	10	29.4	4.6
V308F	IgG1	6	5.9	0.4	2.1	33	3	173	33	11.8	1.9
M252T/S254T/T256E	IgG1	6	10.4	1.5	3.7	34	6	317	67	6.6	1.5
N434S	IgG1	6	7.7	1.5	2.8	33	11	228	75	10	4.6
V259I/V308F	IgG1	6	9.2	1.5	3.3	36	5	262	47	7.9	1.4
V308F/M428L	IgG1	6	11.2	1.1	4.0	38	6	307	50	6.7	1.1
M252Y/V308F	IgG1	6	5.7	0.4	2.0	40	6	140	24	14.7	2.6
M428L/N434S	IgG1	6	12	2.9	4.3	37	9	400	112	5.5	2
V308F/N434S	IgG1	6	8.6	0.3	3.1	28	3	195	25	10.4	1.3
V259I/V308F/M428L	IgG1	6	13.3	2.7	4.8	37	6	383	68	5.3	0.8

Figura 14 (continuación)

Variante de Fc	IgG	n	Vida media (día)			C _{máx} ($\mu\text{g/mL}$)		AUC (día $\cdot\mu\text{g/mL}$)		Eliminación (mL/día/kg)	
			Media	SD	Repeti- ciones	Media	SD	Media	SD	Media	SD
			Estudio 4								
WT (IgG1 Nativo)	IgG1	6	2.9	0.4	1.0	32.5	3.1	72.7	5.8	27.6	2.3
M252Y/S254T/T256E	IgG1	6	11.3	1.8	3.9	40.6	5.8	376.5	60.7	5.4	0.8
V308F/N434M	IgG1	6	4.9	0.8	1.7	38.6	5.4	153.6	21.3	13.2	1.9
V259I/V308F	IgG1	6	7.5	0.8	2.6	37.9	3.8	234.5	23.1	8.6	0.9
V308F	IgG1	6	6.1	0.4	2.1	37.8	1.9	172.2	16.7	11.7	1.2
V308F/Y319I	IgG1	6	6	0.5	2.1	38.1	6.5	206.5	71	10.5	3.1
M428L/N434S	IgG1	6	11.8	0.6	4.1	42	4.6	392.4	52.2	5.2	0.7
V308F/M428L/N434S	IgG1	6	9	0.4	3.1	31.8	7.9	204.6	34.2	10	1.8
V259I/V308F/N434S	IgG1	6	8.5	1.8	2.9	33.4	7.3	254.9	29	7.9	0.9
V259I/V308F/M428L	IgG1	6	10.9	0.6	3.8	35	7.5	295.1	54.5	7	1.3
Estudio 5											
WT (IgG2 Nativo)	IgG2	6	5.9	0.9	1.0	43.8	5	212.3	33.8	9.6	1.5
N434S	IgG2	6	12.2	1.3	2.1	39.1	6.4	381.6	91.6	5.5	1.2
V259I/V308F	IgG2	6	10.2	0.6	1.7	42.3	1.3	342	21.2	5.9	0.4
M428L/N434S	IgG2	6	16.5	1.1	2.8	48	5.8	603.3	72.9	3.4	0.4

Figura 15a

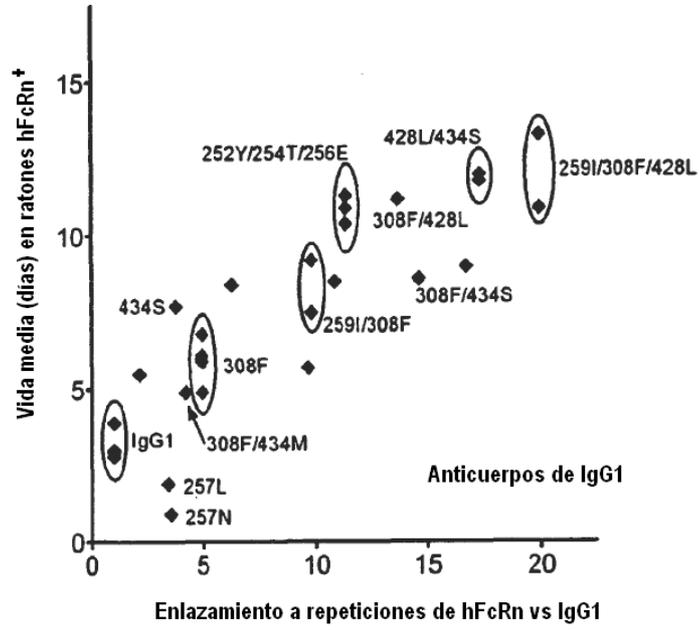


Figura 15b

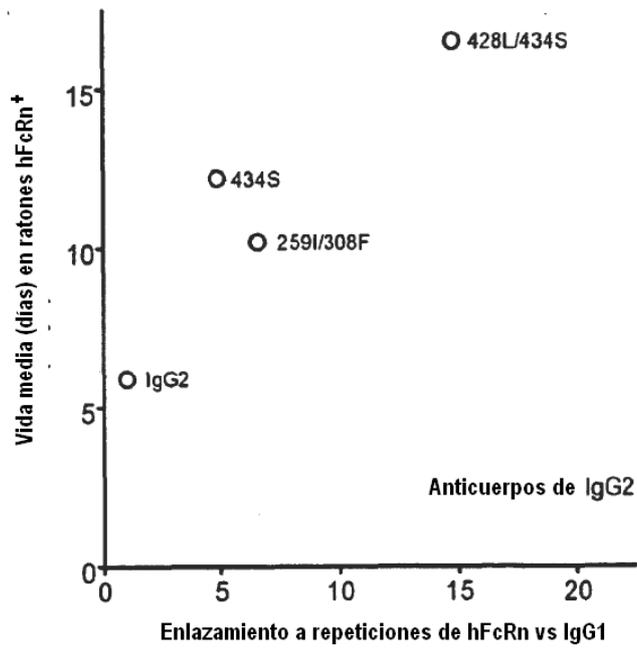


Figura 15c

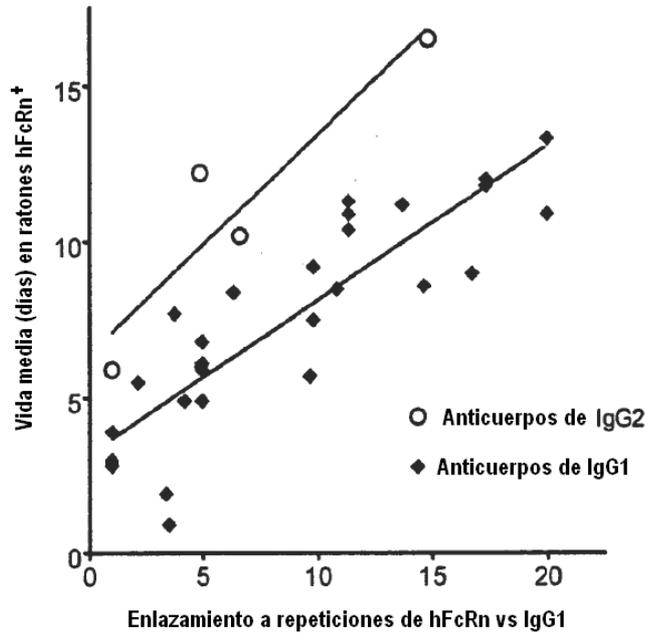


Figura 16

Anti-TNF Fc fusión con IgG1 Fc (SEQ ID NO:30)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Anti-TNF Fc fusión con IgG2 Fc (SEQ ID NO:31)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVCKPCAPGTFSNTTSSTDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGPPPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSPGK

Figura 16 (continuación)

Anti-TNF Fc Fusión con IgG1 259I/308F Fc (SEQ ID

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFNNTSSDIDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEITCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Anti-TNF Fc Fusión con IgG1 428L/434S Fc (SEQ ID NO:33)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFNNTSSDIDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Anti-TNF Fc fusión con IgG2 434S Fc (SEQ ID NO:34)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFNNTSSDIDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Anti-TNF Fc fusión con IgG2 428L/434S Fc (SEQ ID NO:35)

MAPVAVWAALAVGLELWAAHALPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHA
 KVFCTKTSDTVCDSCEDSTYQLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCRPGWYC
 ALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVKPCAPGTFNNTSSDIDICRPHQICNVVAIP
 GNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPSPAEGST
 GDEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
 VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQP
 REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLY
 SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 17

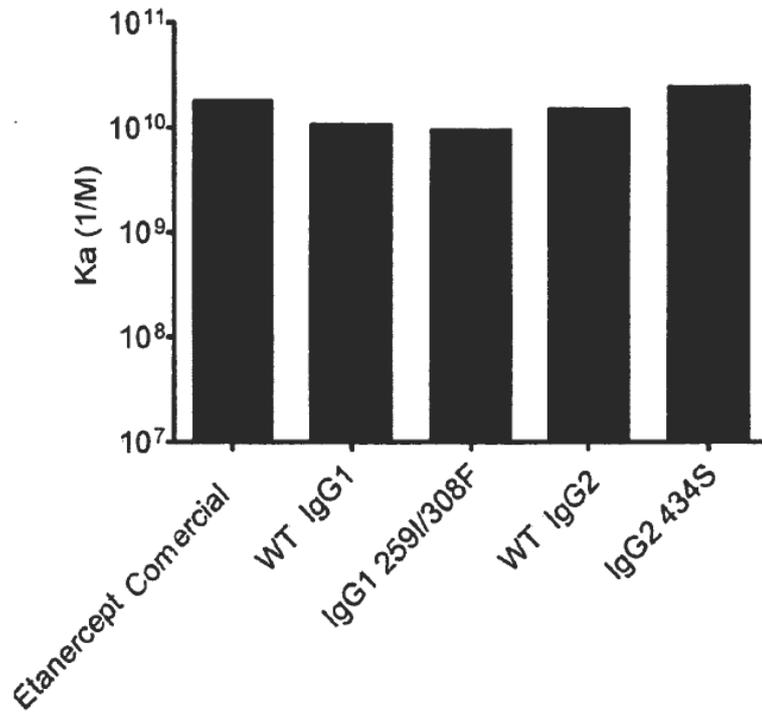


Figura 18

Variante	Región Fc	Asociado de fusión	n	Repeticiones de FcRn	
				Media	SD
WT	IgG1	TNFR		1.00	
V259I/V308F	IgG1	TNFR	4	4.86	2.22
M428L/N434S	IgG1	TNFR	2	7.24	1.57
WT	IgG2	TNFR		1.00	
N434S	IgG2	TNFR	3	6.93	2.02
M428L/N434S	IgG2	TNFR	3	11.78	4.33

Figura 19

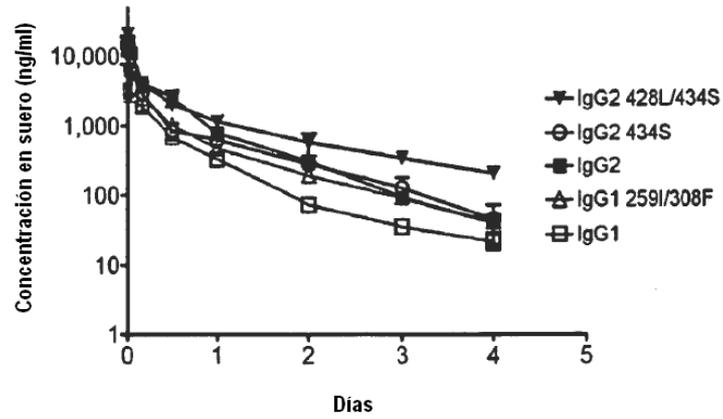


Figura 20

Variante de Fc	Fc	n	Vida media (día)	incremento (%)	C _{máx} (ng/mL)	AUC (día*ng/ml)	Eliminación (mL/día/kg)
WT	IgG1	12	0.60	n/a	22253.3	1324.7	1177.7
V259I/V308F	IgG1	12	0.81	136	12175.6	2291.5	741.9
WT	IgG2	12	0.65	n/a	14580.2	3686.3	423.2
N434S	IgG2	12	0.77	119	12086.8	2531.3	655.8
M428L/N434S	IgG2	12	1.01	156	30676.7	4405.2	354.1

Figura 21a

	Repeticiones de FcRn cyno			Repeticiones de FcRn humano		
	n	Media	SD	n	Media	SD
IgG1 de WT		1.00			1.00	
M252Y/S254T/T256E	2	11.95	2.23	10	11.37	2.90
V259I/V308F	2	8.60	1.86	12	9.79	2.72
M428L/N434S	3	12.18	1.23	14	17.28	6.70
V259I/V308F/M428L	4	12.43	0.57	13	19.94	10.46

Figura 21b

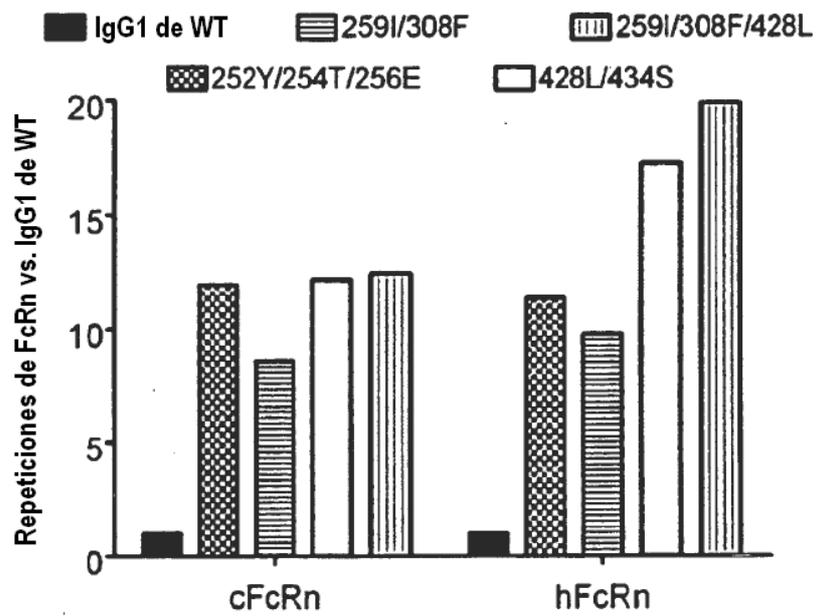


Figura 22

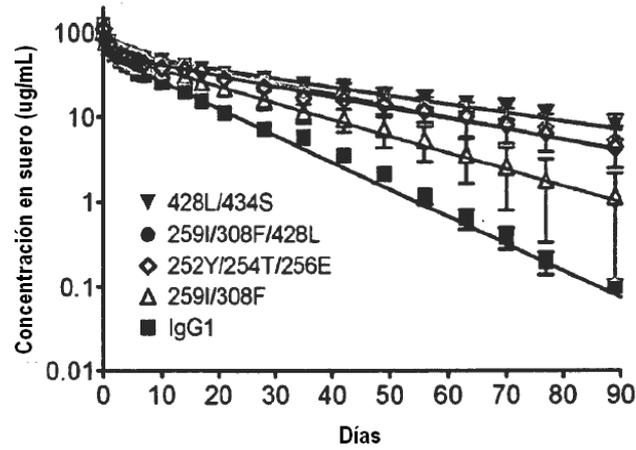


Figura 23

Variante de Fc	IgG	n	Vida media (día)			C _{máx} (ug/mL)		AUC Día*ug/mL		Eliminación mL/día/kg	
			Media	SD	Repeti- ciones	Media	SD	Media	SD	Media	SD
			WT (IgG1 Nativo)	IgG1	3	9.7	1.0	101.2		822.9	
M252Y/S254T/T256E	IgG1	3	24.2	1.6	2.5	111.2	13.9	1919	210.1	2.1	0.2
V259I/V308F	IgG1	3	16.2	6.4	1.7	102.8	3.2	1352.6	367	3.1	0.9
M428L/N434S	IgG1	3	31.1	7.9	3.2	126	17	2660.9	791	1.6	0.6
V259I/V308F/M428L	IgG1	3	25.1	5.9	2.6	124.6	14.3	2301.6	922.5	1.9	0.8