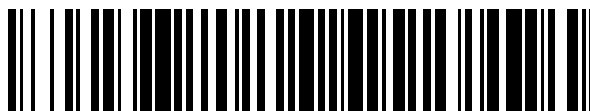


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 910**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/79 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/564 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.1999** **E 06000719 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014** **EP 1746107**

54 Título: **Variantes de anticuerpos y fragmentos de los mismos**

30 Prioridad:

02.04.1998 US 54255

15.01.1999 US 116100 P

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

01.04.2015

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

IDUSOGIE, ESOHE EKinADUESE;

MULKERRIN, MICHAEL GEORGE;

PRESTA, LEONARD G. y

SHIELDS, ROBERT LAIRD

74 Agente/Representante:

MANRESA VAL, Manuel

ES 2 532 910 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 anticuerpos y fragmentos de los mismos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a variantes polipeptídicas que comprenden una región Fc JgG1 o JgG3 humana. Más particularmente, la presente invención se refiere a polipéptidos que contienen la región Fc que han alterado la función efectora como consecuencia de una o más sustituciones de aminoácidos en la región Fc del polipéptido no variante. La presente invención se refiere asimismo a nuevos complejos inmunitarios y a un ensayo para determinar el enlace de un analito, tal como un polipéptido que contiene la región Fc, con un receptor.

15 Descripción de la técnica relacionada

Los anticuerpos son proteínas que presentan especificidad de enlace con un antígeno específico. Los anticuerpos naturales son generalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se encuentra enlazada con una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de distintos isotipos de inmunoglobulinas. Las cadenas pesadas y ligeras presentan asimismo puentes disulfuro intracatenarios separados a intervalos regulares. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un cierto número de dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se encuentra alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se encuentra alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se considera que ciertos aminoácidos particulares constituyen una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término "variable" se refiere a que determinadas partes de los dominios variables difieren considerablemente en la secuencia entre los anticuerpos y son responsables de la especificidad de enlace de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDR) en los dominios variables de tanto la cadena ligera como la cadena pesada. Las partes más conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras naturales comprenden cuatro regiones FR, adoptando en gran medida una configuración de hoja β , unidas por tres CDR, que forman bucles que unen y, en algunos casos, forman parte de la estructura de hoja β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas muy próximas entre sí gracias a las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de enlace con el antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

Los dominios constantes no se encuentran implicados directamente en el enlace de un anticuerpo con un antígeno, pero desempeñan diversas funciones efectoras. En función de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4; IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las distintas clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. De las diversas clases de inmunoglobulinas humanas, se conoce que únicamente activan el complemento las IgG1, IgG2, IgG3 e IgM humanas.

Una representación esquemática de la estructura de la IgG1 natural se ilustra en la figura 1, en la que se indican las diversas partes de la molécula del anticuerpo natural. Mediante la digestión con papaína de los anticuerpos se obtienen dos fragmentos de enlace con el antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un sitio único de enlace con el antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. Se ha determinado la estructura cristalina de la región Fc de la IgG humana (Deisenhofer, *Biochemistry* 20:2361-2370 (1981)). En las moléculas de la IgG humana, la región Fc se genera mediante escisión aminoterminal con papaína hasta Cys 226. La región Fc resulta fundamental para las funciones efectoras de los anticuerpos.

Las funciones efectoras en las que interviene la región Fc del anticuerpo se pueden dividir en dos categorías: (1) funciones efectoras que actúan tras la unión del anticuerpo con un antígeno (dichas funciones implican la participación de la cascada del complemento o de células que presentan el receptor Fc (FcR)); y (2) funciones efectoras que actúan independientemente de la unión con el antígeno (dichas funciones proporcionan persistencia a la circulación y a la capacidad de transferirse a través de barreras celulares por transcitosis). Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* ["Inmunología terapéutica"] 2:77-94 (1995).

Aunque que el enlace de un anticuerpo con el antígeno necesario tiene un efecto neutralizante que puede impedir la unión de un xenoantígeno a su diana endógena (por ejemplo, un receptor o un ligando), la unión por sí sola no puede eliminar el xenoantígeno. Para ser eficiente en la eliminación y/o destrucción de los xenoantígenos, un anticuerpo debe presentar una elevada afinidad con su antígeno y desempeñar unas funciones efectoras eficientes.

Unión con el C1q

El C1q y dos serina proteasas, C1r y C1s, constituyen el complejo C1, el primer componente de la vía de la citotoxicidad que depende del complemento (CDC). El C1q es una molécula hexavalente con un peso molecular de aproximadamente 460.000 y una estructura parecida con un ramo de tulipanes en el que seis "tallos" contiguos se unen a seis regiones de la cabeza globular. Burton and Woof, *Advances in Immunol.* 51:1-84 (1992). Para activar la cascada del complemento, es necesario que el C1q se una a por lo menos dos moléculas de entre la IgG1, la IgG2 o la IgG3 (se considera que la IgG4 no activa el complemento), pero únicamente a una molécula de IgM, unida a la diana antigénica. Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* ["Inmunología terapéutica"] 2:77-94 (1995), página 80.

Basándose en los resultados de las modificaciones químicas y los estudios cristalográficos, Burton *et al.* (*Nature*, 288:338-344 (1980)) indicaron que el sitio de enlace del subcomponente del complemento C1q con la IgG implica las dos últimas cadenas β (carboxiterminales) del dominio CH2. Posteriormente, Burton propuso (*Molec. Immunol.*, 22(3):161-206 (1985)) que la región que comprende los aminoácidos 318-337 podría estar implicada en la fijación del complemento.

Duncan y Winter (*Nature* 332:738-40 (1988)), utilizando mutagénesis dirigida, describieron que los aminoácidos Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión con el C1q. Los datos de Duncan y Winter se obtuvieron analizando la unión de un isotipo IgG2b de ratón con el C1q de conejillo de indias. El papel que desempeñan los aminoácidos Glu318, Lys320 y Lys322 en la unión del C1q se confirmó mediante la capacidad para inhibir la lisis en la que interviene el complemento de un péptido sintético corto que contenía dichos aminoácidos. Unos resultados similares se describen en la patente US n. 5.648.260, publicada el 15 de julio de 1997, y la patente US n. 5.624.821, publicada el 29 de abril de 1997.

Se ha implicado el aminoácido Pro331 en la unión con el C1q analizando la capacidad de las subclases de IgG humanos para realizar la lisis celular en la que interviene el complemento. La mutación de la Ser331 a Pro331 en la IgG4 proporcionó la capacidad de activar el complemento. (Tao *et al.*, *J. Exp. Med.*, 178:661-667 (1993); Brekke *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 24:2542-47 (1994)).

A partir de la comparación de los datos del grupo de Winter y las publicaciones de Tao *et al.* y Brekke *et al.*, Ward y Ghetie llegaron a la conclusión en su publicación que existen por lo menos dos regiones distintas implicadas en la unión del C1q: una en la cadena β del dominio CH2 que presenta los aminoácidos Glu318, Lys320 y Lys322, y la otra en un giro que se encuentra en la proximidad de la misma cadena β , y que contiene un aminoácido clave en la posición 331.

Otras publicaciones indican que los aminoácidos Lys235 y Gly237 de la IgG1 humana, que se encuentran en la región de la bisagra inferior, desempeñan un papel crítico en la fijación y la activación del complemento. Xu *et al.*, *J. Immunol.* 150:152A (Sinopsis) (1993). El documento WO94/29351 publicado el 22 de diciembre 1994 indica que los aminoácidos necesarios para la unión del C1q y el FcR de la IgG1 humana se encuentran en la región aminoterminal del dominio CH2, es decir, los aminoácidos 231-238.

Se ha propuesto además que la capacidad de la IgG para enlazarse con el C1q y activar la cascada del complemento depende asimismo de la presencia, ausencia o modificación de la parte de carbohidrato que se encuentra entre los dos dominios CH2 (que normalmente se encuentra fijada en Asn297). Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* ["Inmunología terapéutica"] 2:77-94 (1995), página 81.

Unión con el receptor Fc

La interacción de la región Fc de un anticuerpo con los receptores Fc (FcR), que son receptores de superficie celular especializados de células hematopoyéticas, puede intervenir asimismo en las funciones efectoras. Los receptores Fc pertenecen a la super familia de las inmunoglobulinas y se ha demostrado que intervienen tanto en la eliminación de patógenos recubiertos de anticuerpos por fagocitosis de los complejos inmunitarios, y en la lisis de los eritrocitos y otras dianas celulares diversas (por ejemplo, células de tumores) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, mediante la citotoxicidad en la que intervienen células dependiente de los anticuerpos (ADCC). Van de Winkel and Anderson, *J. Leuk. Biol.* 49:511-24 (1991).

Se definen los FcR por su especificidad con respecto a los isotipos de las inmunoglobulinas; los receptores Fc de los anticuerpos IgG se denominan Fc γ R, Fc ϵ R los de la IgE, Fc α R los de la IgA y así sucesivamente. Se han

identificado tres subclases de receptores γ : Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Puesto que cada subclase Fc γ R está codificada por dos o tres genes y el corte y empalme alternativo del ARN produce una pluralidad de transcritos, existe una gran diversidad de isoformas de Fc γ R. Los tres genes que codifican la subclase Fc γ RI (Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC) se concentran en la región 1q21.1 del brazo largo del cromosoma 1; los genes que

Aunque el Fc γ RI se enlaza con una IgG monomérica con una alta afinidad, el Fc γ RII y el Fc γ RIII son receptores de baja afinidad, que interactúan con IgG agregadas o que han formado complejos. El método clásico para detectar dichos receptores de baja afinidad es mediante la formación "rosetas" utilizando eritrocitos recubiertos con anticuerpos (EA) sensibilizados con IgG. Bredius et al. analizaron formación de rosetas entre los eritrocitos sensibilizados con IgG y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) que expresan Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb en su superficie celular. La roseta se definió como tres o más EA enlazados mediante PMN (Bredius et al. *Immunology* 83:624-630 (1994)). Véase asimismo, Tax et al. *J. Immunol.* 133(3):1185-1189 (1984); Nagarajan et al. *J. Biol. Chem.* 270(43):25762-25770 (1995); y Warmerdam et al. *J. Immunol.* 147(4):1338-1343 (1991) con respecto a los ensayos con las rosetas. Sin embargo, la unión de dichos "complejos inmunitarios" EA con los FcR no es fácil de cuantificar. Por consiguiente, se han desarrollado complejos más definidos con afinidad detectable para dichos FcR. Por ejemplo, se han formado dímeros de IgG utilizando anticuerpos monoclonales anticadena ligera (Nagarajan et al., *supra* y Warmerdam et al., *supra*) o productos químicos de reticulación (Hogarth et al. *Immunomethods* 4:17-24 (1994); y Tamm et al. *J. Biol. Chem.* 271(7):3659-3666(1996)). Se han analizado asimismo complejos inmunitarios agregados mediante calor con respecto a las células que expresan FcR (Tax et al., *supra* y Tam et al., *supra*).

Se descubrió que el sitio de unión de los Fc γ R en las IgG humanas se encuentra en la región de la bisagra inferior, que afecta principalmente a los aminoácidos las posiciones 233-238, resultando necesarios todos ellos para la actividad de unión completa con los Fc γ R. Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-91 (1991); Chappel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9036-40 (1991); Lund et al., *J. Immunol.*, 147:2657-62 (1991); Lund et al., *Molec. Immunol.*, 29:53-59 (1992); Jefferis et al., *Molec. Immunol.*, 27:1237-40 (1990); y Sarmay et al., *Molec. Immunol.*, 29:633-639 (1992).

La Pro331 de la IgG3 cambió a Ser y la afinidad de dicho mutante con respecto a las células diana analizadas. Se descubrió que la afinidad era seis veces inferior a la de la IgG3 no mutada, lo que indica la implicación del enlace entre la Pro331 y el Fc γ RI en la unión. Morrison et al., *Immunologist*, 2:119-124 (1994); y Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483-91 (1991).

Además, se identificó Glu318 como implicado en la unión con el Fc γ RII.. Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* ["Inmunología terapéutica"] 2:77-94 (1995).

El documento WO 91/01335 describe unas regiones constantes que contienen la IgG3 humana modificada con una región de bisagra total más corta en comparación con la IgG3 humana normal y da a conocer un procedimiento para analizar un anticuerpo con respecto a un antígeno específico o hapteno por su efectividad en la activación del complemento en una especie animal.

Brekke et al. (*Molecular Immunology* 30(16):1419-1425 (1993)) describen la construcción de anticuerpos mutantes IgG3 ratón-humano parecidos a la IgG1 en su pauta de enlaces disulfuro entre las cadenas pesada y ligera y entre las dos cadenas pesadas y comparan las funciones efectoras de dichos anticuerpos mutantes con la IgG3 y la IgG1 normales.

Además, Brekke et al. (*Eur. J. Immunol.* 24:2542- 2547 (1994)) dan a conocer la construcción de moléculas quiméricas (Ig)G4 de inmunoglobulina de ratón / humana anti-5-yodo-4-hidroxi-3-nitrofenacetilo (NIP) con aminoácidos alterados en el dominio C_H2 y describen tres mutantes: Gln-268 se sustituye por His en γ 4 Q268H, Ser-331 se sustituye por Pro en γ 4 S331P y en γ 4 Q268H / S331P se sustituyen ambos aminoácidos.

Asimismo, Redpatii et al. (*Immunology* 93:595-600 (1998)) dan a conocer anticuerpos recombinantes humanos específicos para el antígeno leucocitario CD52 y distintos alotipos de la subclase IgG1 humana, que se compararon con respecto a su capacidad para activar el complemento humano. Además, en la misma se investigaron las funciones de las regiones de la bisagra de distinta longitud de la IgG1 y la IgG3.

RESUMEN DE LA INVENCÓN

La presente invención proporciona una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc de una IgG1 o IgG3 humana, cuya variante presenta una afinidad de unión mejor con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende una sustitución de aminoácidos en la región Fc de IgG en la posición del aminoácido 326, 333 o 334, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del ndice EU tal como se indica en

Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Además se describe una variante de un polipéptido que comprende una región Fc de la IgG humana, cuya variante se enlaza con FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn, pero no activa el complemento y comprende una sustitución de un aminoácido en la posición del aminoácido 322 o en la posición del aminoácido 329, o en ambas posiciones de aminoácidos de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

La publicación se refiere asimismo a una variante de un polipéptido original que comprende una región Fc de una IgG1 o IgG3 humana, cuya variante presenta una afinidad de unión mejor con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende una sustitución de aminoácidos en la región Fc de la IgG1 o IgG3. Por ejemplo, la afinidad de unión de la variante con respecto al C1q humano es aproximadamente el doble o más que la afinidad de unión del polipéptido original con respecto al C1q humano. Preferentemente, el polipéptido original se une al C1q e interviene en la CDC. La variante con mejor afinidad de unión con respecto al C1q humano que el polipéptido original comprende preferentemente una sustitución de un aminoácido en la posición de aminoácido 327 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.

En otro aspecto, la descripción proporciona un variante descrita anteriormente, presentando la variante una mayor afinidad de unión con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende una sustitución de aminoácido en dos o más posiciones de aminoácidos 326, 327, 333 o 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento para modificar un polipéptido que comprende una región Fc de una IgG humana que comprende sustituir un aminoácido en dos o más de las posiciones de aminoácidos 326, 327, 333, 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.

Se describe además un procedimiento para modificar un polipéptido que comprende una región Fc de una IgG humana que comprende la sustitución de un aminoácido en la posición del aminoácido 326, 327, 333 o 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana. El procedimiento comprende además opcionalmente una etapa en la que se identifica una variante con una mejor afinidad de unión con respecto al C1q humano.

La presente invención proporciona asimismo una composición que comprende la variante polipeptídica y un vehículo o diluyente fisiológicamente aceptable. Dicha composición para uso terapéutico potencial es estéril y se puede liofilizar.

Se contemplan unos usos terapéuticos y en diagnósticos para la variante polipeptídica. En una aplicación de diagnóstico, se describe un procedimiento para determinar la presencia de una proteína de interés que comprende exponer una muestra de la que se supone que contiene la proteína de la variante polipeptídica y determinar la unión de la variante polipeptídica con la muestra. En una aplicación terapéutica, se describe un procedimiento para tratar un mamífero que padece un trastorno que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de una variante polipeptídica que comprende una región Fc de una IgG humana, cuya variante se enlaza con FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn pero no activa el complemento y comprende una sustitución de un aminoácido en la posición del aminoácido 270, 322, 329 o 331 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. *Public Health Service*, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

La presente invención proporciona además: un ácido nucleico aislado que codifica la variante polipeptídica; un vector que comprende el ácido nucleico, opcionalmente, unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula hospedadora transformada con el vector; una célula hospedadora que comprende el vector; un procedimiento para producir la variante polipeptídica que comprende cultivar dicha célula hospedadora de tal modo que se exprese el ácido nucleico y recuperar la variante polipeptídica del cultivo de la célula hospedadora (por ejemplo, del medio de cultivo de células hospedadoras) y una variante tal como se ha descrito anteriormente para utilizar como medicamento.

Además se describe un complejo inmunitario que comprende: (a) un polipéptido que contiene una región Fc; (b) una primera molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para el polipéptido que contiene la región Fc; y (c) una segunda molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para la primera molécula diana. Se puede utilizar el complejo inmunitario en un ensayo de unión con el FcR, en particular cuando el FcR presenta una baja afinidad hacia el polipéptido que contiene la región Fc. En la presente memoria se dan a conocer otros usos del complejo inmunitario.

Además, se describe un procedimiento para determinar la unión de un analito, tal como un polipéptido que contiene una región Fc, con un receptor (por ejemplo, un FcR de baja afinidad) que comprende las etapas siguientes realizadas secuencialmente (a) formar un complejo molecular entre el analito y una primera molécula diana, que comprendiendo la primera molécula diana por lo menos dos sitios de unión para el analito; y (b) determinar la unión del complejo molecular de la etapa (a) con el receptor (por ejemplo, para un dominio de unión del receptor recubierto en una placa de ensayo). Opcionalmente, el complejo molecular de la etapa (a) comprende además una segunda molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para la primera molécula diana.

Además, se describe un kit de ensayo, tal como un kit útil para determinar la unión de un analito con un receptor que comprende (a) una primera molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para el analito; y (b) una segunda molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para la primera molécula diana.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática de una IgG natural. Los enlaces disulfuro se representan mediante líneas gruesas entre los dominios CH1 y CL y los dos dominios CH2. V es un dominio variable; C es un dominio constante; L representa la cadena ligera y H representa la cadena pesada.

La figura 2 representa la unión entre el C1q y el anticuerpo C2B8 de tipo natural (wt); el anticuerpo C2B8 con una región constante IgG2 humana (IgG2); y los mutantes K322A, K320A y E318A.

La figura 3 representa la unión entre el C1q y los mutantes P331A, P329A y K322A.

Las figuras 4A (SEC ID No. 1) y 4B (SEC ID No. 2) representan las secuencias de los aminoácidos de la cadena ligera (figura 4A) y de la cadena pesada (figura 4B) del anticuerpo anti-IgE E27.

La figura 5 es un diagrama esquemático del "complejo inmunitario" preparado para utilizar en el ensayo con el FcR descrito en el ejemplo 1. Se representan el hexámero que comprende tres moléculas de anticuerpo anti-IgE (el "polipéptido que contiene la región Fc") y tres moléculas IgE (la "primera molécula diana"). La IgE presenta dos "sitios de unión" para el anticuerpo anti-IgE (E27) en la región Fc de la misma. Cada molécula de IgE del complejo puede unirse a dos moléculas VEGF ("el segundo polipéptido diana"). La VEGF presenta dos "sitios de unión" para la IgE.

La figura 6 representa los resultados obtenidos de la unión del C1q con los mutantes D270K y D270V en comparación con el C2B8 natural.

La figura 7 representa la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de los mutantes D270K y D270V en comparación con el C2B8 natural.

La figura 8 representa los resultados de la prueba ELISA de la unión con el C1q para el anticuerpo C2B8 natural producido en 293 células (293-Wt-C2B8), el anticuerpo C2B8 natural producido en CHO (CHO-Wt-C2B8) y diversos anticuerpos mutantes.

La figura 9 representa los resultados de la prueba ELISA de la unión con el C1q obtenidos para el anticuerpo C2B8 natural (wt) y diversos anticuerpos mutantes tal como se determinó en el ejemplo 3.

La figura 10 representa la estructura tridimensional de un Fc de una IgG humana, resaltando los aminoácidos: Asp270, Lys326, Pro329, Pro331, Lys322 y Glu333.

La figura 11 representa los resultados de la prueba ELISA de la unión con el C1q obtenidos para el anticuerpo C2B8 natural y diversos anticuerpos mutantes tal como se determinó en el ejemplo 3.

La figura 12 representa los resultados de la prueba ELISA de la unión con el C1q obtenidos para el anticuerpo C2B8 natural y los dobles mutantes K326M-E333S y K326A-E333A.

La figura 13 representa la CDC del anticuerpo C2B8 natural y los dobles mutantes K326M-E333S y K326A-E333A.

La figura 14 representa los resultados de la prueba ELISA de la unión con el C1q obtenidos para el C2B8 con una región constante de la cadena pesada de la IgG4 humano (IgG4), el C2B8 natural (Wt-C2B8), el C2B8 con una región constante de la cadena pesada de la IgG2 humana (IgG2) y los anticuerpos mutantes tal como se describe en el ejemplo 3.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

I. Definiciones

A lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, la numeración de los aminoácidos en una cadena pesada de IgG es la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). El "índice EU según Kabat" se refiere a la numeración de los aminoácidos del anticuerpo EU IgG1 humano.

El término "región Fc" se utiliza para definir una región carboxiterminal de una cadena pesada de IgG tal como se representa en la figura 1. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de IgG pueden variar ligeramente, la región Fc de la cadena pesada de una IgG humana se define normalmente al tramo desde el aminoácido de la posición Cys226 hasta el carboxiterminal. El término "polipéptido que contiene la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véanse las definiciones posteriormente), que comprende una región Fc.

La región Fc de una IgG comprende dos dominios constantes, CH2 y CH3, tal como se representa en la figura 1. El dominio "CH2" de una región Fc de una IgG humana (al que se hace referencia asimismo como dominio "Cy2") comprende normalmente desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 340. El dominio CH2 es único ya que no se encuentra estrechamente emparejado con otro dominio. En cambio, se interponen unas cadenas ramificadas de carbohidratos enlazadas con N entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado con que el carbohidrato puede proporcionar un sustituto para el emparejamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985).

Normalmente se define la "región bisagra" como que comprende desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)). Se pueden alinear regiones bisagra de otros isotipos de IgG con la secuencia de la IgG1 colocando los aminoácidos de cisteína primero y último formando enlaces S-S entre las cadenas pesadas en las mismas posiciones.

El "C1q" es un polipéptido que comprende un sitio de unión para la región Fc de una inmunoglobulina. El C1q junto con dos serina proteasas, C1r y C1s, forma el complejo C1, el primer componente la ruta de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El C1q humano se puede adquirir comercialmente en, por ejemplo, Quidel, San Diego, CA.

Se utiliza el término "receptor Fc" o "FcR" para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es uno que se une un anticuerpo IgG (un receptor γ) y comprende receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, comprendiendo variantes alélicas y formas empalmadas alternativamente de dichos receptores. Los FcRs se describen en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, entre ellos los que se identifiquen en el futuro, quedan comprendidos por el término "FcR" en la presente memoria. El término comprende asimismo el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

El término "dominio de unión" se refiere a la región de un polipéptido que se une a otra molécula. En el caso de un FcR, el dominio de unión puede comprender una parte de una cadena polipeptídica del mismo (por ejemplo, la cadena α del mismo) que es responsable de la unión de una región Fc. Un dominio de unión útil es el dominio extracelular de una cadena α del FcR.

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y comprende específicamente los anticuerpos monoclonales (entre ellos los anticuerpos monoclonales de longitud completa), los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica pretendida.

"Fragmentos de anticuerpos", tal como se define para el propósito de la presente invención, comprenden una parte de un anticuerpo intacto, comprendiendo generalmente la región de unión con el antígeno o la variable del anticuerpo intacto, mientras conserven por lo menos la región CH2 de un dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG, que comprende los aminoácidos 322, 329 y 331, y presenta la capacidad, solo o en combinación con otro fragmento de anticuerpo, para unirse específicamente a un antígeno seleccionado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos comprenden los anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpos monocatenarios; y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpos conservan preferentemente por lo menos una de la bisagra y opcionalmente la región CH1 de una

cadena pesada de la IgG. Más preferentemente, los fragmentos de anticuerpos conservan toda la región constante de una cadena pesada de IgG y comprenden una cadena ligera de IgG.

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades inferiores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente comprenden distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden realizar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente US n. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" se pueden aislar asimismo a partir de genotecas de anticuerpos en fagos utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria comprenden específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos a partir de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particulares, aunque el resto de la(s) cadena(s) se idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos obtenidos a partir de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica pretendida (patente US n. 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que comprenden una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los que los aminoácidos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por aminoácidos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que presenta la especificidad, la afinidad y la capacidad pretendida. En algunos casos, los aminoácidos de la región de marco de Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los aminoácidos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender aminoácidos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador. Dichas modificaciones se realizan para ajustar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, correspondiendo todas o sustancialmente todas las asas hipervariables a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá asimismo opcionalmente por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

El término "región hipervariable", cuando se utiliza en la presente memoria se refiere a los aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión con el antígeno. La región hipervariable comprende aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (es decir, los aminoácidos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos aminoácidos de un "asa hipervariable" (es decir, los aminoácidos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de cadena pesada; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los aminoácidos "marco" o "FR" son aquellos aminoácidos del dominio variable distintos a los aminoácidos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria.

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

El "dominio de unión con el ligando", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier receptor de superficie celular natural o a cualquier región o derivado del mismo que conserva por lo menos una capacidad cualitativa de unión con el ligando de un receptor natural correspondiente. En una forma de realización específica, el

receptor procede de un polipéptido de la superficie celular que presenta un dominio extracelular que es homólogo a un miembro de la super familia de inmunoglobulinas. Otros receptores, que no son miembros de la super familia de inmunoglobulinas pero que quedan, no obstante, comprendidos específicamente por la presente definición, son receptores de citoquinas y, en particular, receptores con actividad tirosina-cinasa (receptor tirosina-cinasas), miembros de las super familias de la hematopoyetina y del receptor del factor de crecimiento del tejido nervioso, y moléculas de adhesión celular, por ejemplo, selectinas (E, L y P).

El término "dominio de unión con el receptor" se utiliza para indicar cualquier ligando natural para un receptor, comprendiendo las moléculas de adhesión celular, o cualquier región o derivado de dicho ligando natural que conserva por lo menos una capacidad cualitativa de enlace con el receptor de un ligando natural correspondiente. Dicha definición, entre otras, comprende específicamente las secuencias de unión de ligandos para los receptores mencionados anteriormente.

Una "quimera anticuerpo-inmunoadhesina" comprende una molécula que combina por lo menos un dominio de unión de un anticuerpo (tal como se define en la presente memoria) con por lo menos una inmunoadhesina (tal como se define en la presente solicitud). Los ejemplos de quimeras anticuerpo-inmunoadhesina son las quimeras biespecíficas CD4-IgG descritas en Berg *et al.*, PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991) y Chamow *et al.*, *J. Immunol.* 153:4268 (1994).

Un polipéptido "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/u obtenido de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido y pueden comprender enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las formas de realización preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta más del 95 % en peso de polipéptido según lo determinado por el procedimiento de Lowry y, más preferentemente, más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos aminoterminal o interna utilizando un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado comprende el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no se encontrará presente por lo menos un componente del entorno natural del polipéptido. Sin embargo, el polipéptido aislado se preparará normalmente mediante por lo menos una etapa de purificación.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento comprenden aquellos que ya presentan el trastorno así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

Un "trastorno" es cualquier enfermedad que mejorará con el tratamiento realizado con la variante polipeptídica. Ello comprende trastornos o enfermedades crónicas y agudas, entre ellas los estados patológicos que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

La palabra "marcador", cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el polipéptido. El marcador puede detectarse por sí mismo (por ejemplo, los marcadores de radioisótopos o los marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición de un sustrato que se puede detectar.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante a la que se encuentra unida normalmente en la fuente natural del ácido nucleico del polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta a la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el polipéptido en las que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una posición cromosómica distinta a la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son aptas para procariotas, por ejemplo, comprenden un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión con el ribosoma. Se conoce que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretor se une operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se une operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio

de unión con un ribosoma se une operativamente a una secuencia codificante si está dispone de tal modo que facilita la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. El enlace se alcanza mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se utilizan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

En la presente memoria, las expresiones "célula", "estirpe celular" y "cultivo celular" se utilizan indistintamente y todos estos términos comprenden la descendencia. Por lo tanto, las palabras "transformantes" y "células transformadas" comprenden la célula primaria en cuestión y los cultivos obtenidos de la misma independientemente del número de transferencias. Se entiende asimismo que toda la descendencia puede no ser exactamente idéntica en lo que se refiere al contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Ello incluye la descendencia mutante que presenta la misma función o actividad biológica que la examinada en la célula originalmente transformada. Cuando se pretenda utilizar designaciones distintas, quedará claro a partir del contexto.

El término "complejo molecular", cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a la estructura relativamente estable que se forma cuando se unen entre sí (preferentemente de un modo no covalente) dos o más moléculas heterólogas (por ejemplo, polipéptidos). El complejo molecular preferido en la presente memoria es un complejo inmunitario.

"Complejo inmunitario" se refiere a la estructura relativamente estable que se forma cuando por lo menos una molécula diana y por lo menos un polipéptido que contiene la región Fc heteróloga se enlazan entre sí formando un complejo de mayor peso molecular. Los ejemplos de complejos inmunitarios son los agregados antígeno-anticuerpo y los agregados molécula diana-inmunoaderina. El término "complejo inmunitario", tal como se utiliza en la presente memoria, excepto cuando se indique lo contrario, se refiere a un complejo ex vivo (es decir, distinto a la forma o entorno en que se puede encontrar en la naturaleza). Sin embargo, el complejo inmunitario se puede administrar, por ejemplo, a un mamífero para analizar la depuración del complejo inmunitario en el mamífero.

El término "molécula diana" se refiere a una molécula, normalmente un polipéptido, que puede unirse a una molécula heteróloga y que presenta uno o más sitios de unión para la molécula heteróloga. El término "sitio de unión" se refiere a una región de una molécula al que se puede enlazar otra molécula. La "primera molécula diana", en la presente memoria, comprende por lo menos dos sitios de unión distintos (por ejemplo, entre dos y cinco sitios de unión separados) para un analito (por ejemplo, un polipéptido que contiene región Fc) de tal modo que se pueden unir por lo menos dos moléculas de analito a la primera molécula diana. En la forma de realización preferida de la presente invención, los dos o más sitios de unión son idénticos (por ejemplo, presentan la misma secuencia de aminoácidos, siendo la molécula diana un polipéptido). En el ejemplo 1 que se describirá posteriormente, la primera molécula diana fue una IgE y presentaba dos sitios de unión separados en la región Fc de la misma a los que podía unirse el polipéptido que contiene la región Fc (un anticuerpo anti-IgE, E27). Otras primeras moléculas diana comprenden dímeros de monómeros sustancialmente idénticos (por ejemplo, neurotrofinas, IL8 y VEGF) o son polipéptidos que comprenden dos o más cadenas polipeptídicas sustancialmente idénticas (por ejemplo, anticuerpos o inmunoaderinas). La "segunda molécula diana" comprende por lo menos dos sitios de unión distintos (por ejemplo, entre dos y cinco sitios de unión separados) para la primera molécula diana de tal modo que se pueden unir por lo menos dos primeras moléculas diana a la segunda molécula diana. Preferentemente, los dos o más sitios de unión son idénticos (por ejemplo, presentan la misma secuencia de aminoácidos, siendo la molécula diana un polipéptido). En el ejemplo 2, la segunda molécula diana fue VEGF, que presenta un par de sitios de unión distintos a los que se podía enlazar el dominio variable del anticuerpo IgE. Se contemplan otras segundas moléculas diana, por ejemplo, otros dímeros de monómeros sustancialmente idénticos (por ejemplo, neurotrofinas o IL8) o polipéptidos que comprenden dos o más dominios sustancialmente idénticos (por ejemplo, anticuerpos o inmunoaderinas).

Un "analito" es una sustancia que se va a analizar. El analito preferido es un polipéptido que contiene región Fc que se va a analizar con respecto a su capacidad para unirse a un receptor Fc.

Un "receptor" es un polipéptido que puede unirse a por lo menos un ligando. El receptor preferido es un receptor de superficie celular que presenta un dominio de unión con un ligando extracelular y, opcionalmente, otros dominios (por ejemplo, un dominio transmembrana, un dominio intracelular y/o un anclaje de membrana). El receptor a analizar en el ensayo descrito en la presente memoria puede ser un receptor intacto o un fragmento o derivado del mismo (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende el dominio de unión del receptor fusionada a uno o más polipéptidos heterólogos). Además, el receptor a analizar con respecto a sus propiedades de enlace puede estar presentes en una célula o aislado y opcionalmente recubierto en una placa de ensayo o en alguna otra fase sólida.

La frase "receptor de baja afinidad" se refiere a un receptor que presenta una afinidad de unión débil para un ligando de interés, por ejemplo, que presenta una constante de enlace de aproximadamente 50 nM o una afinidad inferior.

Los ejemplos de receptores de baja afinidad comprenden el FcγRII y el FcγRIII, así como moléculas de adhesión, tales como las integrinas.

Un "polipéptido original" es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que carece de una o más de las sustituciones de la región Fc que se dan a conocer en la presente memoria y/o que difiere en la función efectora en comparación con una variante polipeptídica tal como se describe en la presente memoria. El polipéptido original puede comprender una secuencia de la región Fc natural o una región Fc con modificaciones de la secuencia de aminoácidos existentes (tales como adiciones, deleciones y/o sustituciones).

II.. Formas de realización de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para realizar una variante de un polipéptido. El polipéptido "original", "inicial" o "no variante" se prepara utilizando los métodos disponibles en la técnica para generar polipéptidos que comprenden una región Fc. En la forma de realización preferida de la presente invención, el polipéptido es un anticuerpo y se describirán más detalladamente en los apartados siguientes los ejemplos de procedimientos para generar anticuerpos. Sin embargo, el polipéptido puede ser cualquier otro polipéptido que comprenda una región Fc, por ejemplo, una inmunoadhesina. Los procedimientos para realizar inmunoadhesinas se describirán más detalladamente posteriormente.

El polipéptido inicial de interés particular en la presente memoria es generalmente uno que se une al C1q y presenta citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente memoria sirven generalmente para alterar la capacidad del polipéptido inicial para unirse al C1q y/o modificar su función de citotoxicidad dependiente del complemento, por ejemplo, reducir y preferentemente eliminar dichas funciones efectoras. Sin embargo, en la presente memoria se contemplan polipéptidos que comprenden sustituciones en una o más de las posiciones descritas con unas mejores funciones efectoras. Por ejemplo, el polipéptido inicial puede ser incapaz de unirse al C1q y/o intervenir en la CDC y se puede modificar según las instrucciones de la presente memoria de tal forma que adquiera dichas funciones efectoras. Además, los polipéptidos con actividad de enlace con el C1q preexistente, que presentan además opcionalmente la capacidad de intervenir en la CDC se pueden modificar de tal modo que se mejore una o ambas de dichas actividades.

Para generar la variante del polipéptido, se introducen una o más alteraciones de aminoácidos (por ejemplo sustituciones) en la región Fc del polipéptido inicial. Las posiciones de los aminoácidos a modificar se seleccionan generalmente de entre las posiciones de cadena pesada 270, 322, 326, 327, 329, 331, 333 y 334, siendo la numeración de los aminoácidos de una cadena pesada de una IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). La región Fc procede preferentemente de una IgG humana y más preferentemente de una IgG1 humana o de IgG3 humana. La región Fc de una IgG1 humana puede ser un alotipo humano A o no A.

En las IgG humanas se conserva la prolina en la posición 329. Dicho aminoácido se sustituye preferentemente por alanina, sin embargo, se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido, por ejemplo, serina, treonina, asparagina, glicina o valina.

En la IgG1, la IgG2 y la IgG3 humanas se conserva la prolina en la posición 331, pero no en la IgG4 (que presenta un aminoácido serina en la posición 331). El aminoácido 331 se sustituye preferentemente por alanina u otro aminoácido, por ejemplo, serina (en las regiones de las IgG distintas de la IgG4), glicina o valina.

Se conserva la lisina 322 en las IgG humanas y dicho aminoácido se sustituye preferentemente por una alanina, pero se contempla la sustitución con cualquier otro aminoácido, por ejemplo, serina, treonina, glicina o valina.

Se conserva el D270 en las IgGs humanas y este aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido, por ejemplo, alanina, serina, treonina, glicina, valina o lisina.

Se conserva asimismo el K326 en las IgG humanas. Dicho aminoácido se puede sustituir por otro aminoácido, comprendiendo, pero sin limitarse a los mismos, valina, ácido glutámico, alanina, glicina, ácido aspártico, metionina o triptófano, prefiriéndose el triptófano.

Asimismo, se conserva asimismo el E333 en las IgG humanas. El E333 se sustituye preferentemente por un aminoácido con un volumen de cadena lateral inferior, tal como valina, glicina, alanina o serina, prefiriéndose la serina.

Se conserva el K334 en las IgG humanas y se puede sustituir por otro aminoácido tal como alanina u otro aminoácido.

En la IgG1 y la IgG3 humanas el aminoácido 327 es una alanina. A fin de generar una variante con una mejor unión del C1q, dicha alanina se puede sustituir con otro aminoácido tal como glicina. En la IgG2 y la IgG4, el aminoácido 327 es una glicina y este se puede sustituir por alanina (u otro aminoácido) para disminuir el enlace con el C1q.

- 5 Preferentemente, se combinan las sustituciones en dos, tres o todas las posiciones 326, 327, 333 o 334, opcionalmente con otras sustituciones de la región Fc, para generar un polipéptido con una mejor unión con el C1q humano y, preferentemente una mejor actividad CDC *in vitro* o *in vivo*.

10 En una forma de realización, se altera únicamente una de las ocho posiciones identificadas anteriormente a fin de generar la variante polipeptídica. Preferentemente se altera únicamente un aminoácido 270, 329 o 322 si este es el caso. Alternativamente, se modifican dos o más de las posiciones identificadas anteriormente. Si se van a combinar sustituciones, generalmente sustituciones que mejoran la unión con el C1q humano (por ejemplo, se combinan las posiciones de los aminoácidos 326, 327, 333 y 334) o aquellas que disminuyen el enlace con el C1q humano (por ejemplo, las posiciones de los aminoácidos 270, 322, 329 y 331). En esta última forma de realización, se pueden
15 sustituir las cuatro posiciones (es decir, 270, 322, 329 y 331). Se puede generar una variante en la que el aminoácido natural de la posición 329 de la región constante de la cadena pesada humana se sustituye con otro aminoácido, opcionalmente junto con una sustitución del aminoácido de la posición 331 y/o sustitución del aminoácido de la posición 322. De lo contrario, el aminoácido natural de la posición 331 y el aminoácido natural de la posición 322 de la región Fc de la IgG humana se pueden sustituir con otro aminoácido. Se puede combinar
20 asimismo una sustitución de un aminoácido en la posición 270 con una o más sustituciones adicionales en las posiciones 322, 329 y/o 331.

25 El ADN que codifica la secuencia de aminoácidos variante del polipéptido inicial se prepara mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos comprenden, pero sin limitarse a los mismos, la preparación por mutagénesis dirigida al sitio (o en la que intervienen oligonucleótidos), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de un DNA preparado anteriormente que codifica el polipéptido.

30 La mutagénesis dirigida es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución. Dicho método es muy conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Carter *et al.* *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443 (1985) y Kunkel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1987)). En pocas palabras, al realizar la mutagénesis dirigida al sitio de ADN, el ADN inicial se ve alterado por la primera hibridación de un oligonucleótido que codifica la mutación pretendida con una sola cadena de dicho ADN inicial. Tras la hibridación, se utiliza una ADN polimerasa para sintetizar una segunda cadena, utilizando el oligonucleótido hibridado como cebador y utilizando la cadena única del ADN inicial como molde. De este modo, se incorpora el oligonucleótido que codifica la mutación pretendida en el ADN bicatenario
35 resultante.

La mutagénesis por PCR también es apta para realizar variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido inicial. Véanse Higuchi, in *PCR Protocols*, p. 177-183 (Academic Press, 1990) y Vallette *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 17:723-733 (1989). En pocas palabras, cuando se utilizan cantidades pequeñas de ADN molde como material inicial
40 en una PCR, se pueden utilizar cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente de un ADN molde para generar unas cantidades relativamente grandes de un fragmento de ADN específico que difiere de la secuencia molde únicamente en las posiciones en las que los cebadores difieren del molde.

Otro procedimiento para preparar variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por Wells *et al.*, *Gene* 34:315-323 (1985). El material inicial es el plásmido (u otro vector) que comprende el ADN del polipéptido inicial a mutar. Se identifican uno o más codones del ADN inicial a mutar. Debe existir un único sitio de endonucleasa de restricción en cada lado del uno o más sitios de mutación identificados. Si no existen dichos sitios de restricción, pueden generarse utilizando el procedimiento de mutagénesis en la que intervienen oligonucleótidos descrito anteriormente para introducirlos en las posiciones adecuadas del ADN del polipéptido inicial. Se corta el
45 ADN del plásmido en dichos sitios para linealizarlo. Se sintetizó un oligonucleótido bicatenario que codifica la secuencia del ADN entre los sitios de restricción pero que contiene una o más mutaciones pretendidas utilizando procedimientos estándar, en los que las dos cadenas del oligonucleótido se sintetizaron por separado y a continuación se hibridaron juntas utilizando técnicas estándar. Se conoce dicho oligonucleótido bicatenario como casete. Dicho casete está diseñado para presentar unos extremos 5' y 3' que son compatibles con los extremos del plásmido linealizado, de tal modo que pueda ligarse directamente al plásmido. Dicho plásmido contiene ahora la
50 secuencia de ADN mutada.

Alternativamente, o adicionalmente, se puede determinar la secuencia de aminoácidos pretendida que codifica una variante polipeptídica y se puede generar sintéticamente una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha variante
60 de la secuencia de aminoácidos.

Se pueden someter la(s) variante(s) polipeptídica(s) preparada(s) de este modo a modificaciones adicionales, a menudo dependiendo del uso previsto del polipéptido. Dichas modificaciones pueden implicar la alteración adicional de la secuencia de aminoácidos, la fusión a polipéptido(s) heterólogo(s) y/o modificaciones covalentes.

Por ejemplo, puede resultar útil combinar las sustituciones de los aminoácidos anteriores con una o más sustituciones adicionales de aminoácidos que reduzcan o eliminen el enlace con el FcR. Por ejemplo, los aminoácidos naturales de una o más de las posiciones de la cadena pesada 233-238, 318 o 331 (siendo la numeración de los aminoácidos de una cadena pesada de IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, (*supra*) se pueden sustituir por aminoácido(s) no natural(es), por ejemplo, alanina.

En lo que se refiere a las alteraciones adicionales de la secuencia de aminoácidos, se puede sustituir asimismo cualquier aminoácido de cisteína no implicado en mantener la conformación apropiada de la variante polipeptídica, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar una reticulación aberrante.

Otro tipo de sustitución de aminoácidos sirve para alterar la pauta de glucosilación del polipéptido. Ello se puede realizar mediante la delección de una o más grupos carbohidrato que se encuentran en el polipéptido y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el polipéptido. La glucosilación de polipéptidos normalmente se encuentra enlazada a N o a O. Enlazada a N se refiere la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un aminoácido asparagina. Las secuencias de los tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de dichas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glucosilación potencial. La glucosilación enlazada a O se refiere a la unión de uno de los glúcidos N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, habitualmente serina o treonina, aunque se pueden utilizar asimismo 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. La adición de sitios de glucosilación al polipéptido se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de tal modo que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación enlazados a N). La alteración se puede realizar asimismo mediante la adición de, o sustitución por, uno o más aminoácidos serina o treonina a la secuencia polipeptídica original (para sitios de glucosilación enlazada a O). Una variante de ejemplo de glucosilación presenta una sustitución del aminoácido Asn 297 de la cadena pesada.

Se puede someter la variante polipeptídica a uno o más ensayos para analizar cualquier cambio en la actividad biológica en comparación con el polipéptido inicial. Por ejemplo, se puede analizar la capacidad de la variante para enlazarse con el C1q e intervenir en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Para determinar la unión del C1q, se puede realizar un ELISA de unión con el C1q. En pocas palabras, se pueden recubrir placas de ensayo durante la noche a 4 °C con la variante polipeptídica o el polipéptido inicial (control) en una disolución amortiguadora de recubrimiento. A continuación se pueden lavar y bloquear las placas. Tras el lavado, se puede añadir una muestra de C1q humano a cada pocillo e incubarse durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, se pueden añadir 100 µl de un anticuerpo anticomplemento C1q conjugado con peroxidasa de oveja a cada pocillo e incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. Se puede lavar de nuevo la placa con una disolución amortiguadora de lavado y se pueden añadir 100 µl de disolución amortiguadora que contiene OPD (O-fenilendiaminodihidrocloruro (Sigma)) a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, se puede dejar continuar durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 4,5 N. A continuación se puede leer la absorbancia en (492-405) nm.

Un ejemplo de variante polipeptídica es uno que presenta una "reducción significativa en la unión del C1q" en dicho ensayo. Ello significa que aproximadamente 100 µg/ml de la variante polipeptídica presentan aproximadamente 50 veces o más reducción en la unión del C1q en comparación con 100 µg/ml de un anticuerpo de control que presenta una región Fc de la IgG1 no mutada. En la forma de realización más preferida, la variante polipeptídica "no se une al C1q", es decir, 100 µg/ml de la variante polipeptídica presenta aproximadamente 100 veces o más de reducción en la unión del C1q en comparación con 100 µg/ml del anticuerpo de control.

Otro ejemplo de variante es uno que "presenta una mejor afinidad de unión hacia el C1q humano que el polipéptido original". Dicha molécula puede presentar, por ejemplo, aproximadamente dos veces o más y, preferentemente, aproximadamente cinco veces o más, una mejor unión del C1q humano en comparación con el polipéptido original (por ejemplo, en los valores de CI₅₀ para dichas dos moléculas). Por ejemplo, la unión del C1q humano puede ser entre aproximadamente dos veces y aproximadamente 500 veces y, preferentemente, entre aproximadamente dos veces o entre aproximadamente cinco veces y aproximadamente 1000 veces mejor en comparación con el polipéptido original.

Para analizar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). En pocas palabras, se pueden diluir diversas concentraciones de la variante polipeptídica y el complemento humano con una disolución amortiguadora. Las células que expresan el antígeno al que se une la variante polipeptídica se pueden diluir hasta a una densidad de $\sim 1 \times 10^6$ células/ml. Se pueden añadir mezclas de la variante polipeptídica, complemento humano diluido y células que expresan el antígeno a una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano y dejarse incubar durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % para facilitar la lisis celular en la que

interviene el complemento. A continuación se pueden añadir 50 µl de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo e incubar durante la noche a 37 °C. Se determina la absorbancia utilizando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados se pueden expresar en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Las concentraciones de las muestras se pueden calcular a partir de una curva normal y se indica el porcentaje de la actividad en comparación con el polipéptido no variante para la variante polipeptídica de interés.

Otro ejemplo adicional de variante "no activa el complemento". Por ejemplo, 0,6µg/ml de la variante polipeptídica presentan aproximadamente entre el 0 y el 10 % de actividad de CDC en este ensayo en comparación con 0,6 µg/ml de un anticuerpo de control que presenta una región Fc de la IgG1 no mutada. Preferentemente, no parece que la variante presente actividad alguna de CDC en el ensayo de la CDC anterior.

La presente invención se refiere asimismo a una variante polipeptídica con una mejor CDC en comparación con un polipéptido original, por ejemplo, presentando entre aproximadamente dos veces y aproximadamente 100 veces una mejor actividad de CDC *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en los valores de CI_{50} para cada molécula que se compara).

Preferentemente, la variante polipeptídica conserva sustancialmente la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el polipéptido no variante, es decir, la capacidad de unión no es inferior a aproximadamente 20 veces, por ejemplo, no es inferior a aproximadamente 5 veces la del polipéptido no variante. Se puede determinar la capacidad de unión de la variante polipeptídica utilizando técnicas tales como, por ejemplo, la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la precipitación radioinmunológica (RIA).

Se puede analizar asimismo la capacidad de la variante polipeptídica para unirse con un FcR. Cuando el FcR es un receptor de Fc de alta afinidad, tal como FcγRI o FcRn, se puede medir la unión mediante la valoración de la variante polipeptídica monomérica y determinando la variante polipeptídica unida utilizando un anticuerpo que se une específicamente a la variante polipeptídica en un formato de ELISA estándar (véase el ejemplo 2 posteriormente). En el apartado siguiente se describe más detalladamente otro ensayo de unión con el FcR de baja afinidad.

Preferentemente, la variante conserva la capacidad de unirse a uno o más FcR, por ejemplo, la capacidad de la variante polipeptídica para unirse a FcγRI, FcγRII, FcγRIII y/o FcRn es no se reduce más de aproximadamente 20 veces, preferentemente no es más de aproximadamente 10 veces inferior y más preferentemente no más de aproximadamente dos veces inferior en comparación con el polipéptido inicial tal como se determina en los ensayos de FcγRI o FcRn del ejemplo 2 o los ensayos de FcγRII o FcγRIII descritos en el apartado siguiente.

A. Ensayo de unión con el receptor y complejo inmunitario

En la presente memoria se describe el desarrollo de un ensayo de unión con el receptor que resulta particularmente útil para determinar la unión de un analito de interés con un receptor en el que la afinidad del analito hacia el receptor es relativamente baja, por ejemplo, de escala micromolar, tal como es el caso de FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcγRIIIb. El procedimiento implica la formación de un complejo molecular que presenta una mejor afinidad hacia el receptor de interés en comparación con el analito que no forma complejo. El complejo molecular preferido es un complejo inmunitario que comprende: (a) un polipéptido que contiene la región Fc (tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina); (B) una primera molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para el polipéptido que contiene la región Fc; y (c) una segunda molécula diana que comprende por lo menos dos sitios de unión para la primera molécula objetivo.

En el ejemplo 1 que se describirá posteriormente, el polipéptido que contiene la región Fc es un anticuerpo anti-IgE, tal como el anticuerpo E27 (figuras 4A a 4B). El E27, cuando se mezcla con la IgE humana con una proporción molar de 1:1, forma un hexámero estable que consiste en tres moléculas de E27 y tres moléculas de IgE. En el ejemplo 1 que se describirá posteriormente, la "primera molécula diana" es una forma quimérica de la IgE en la que la parte Fab de un anticuerpo anti-VEGF se fusiona con la parte Fc de la IgE humana y la "segunda molécula diana" es el antígeno al que se fija la parte Fab (es decir, VEGF). Cada molécula de IgE se une con dos moléculas de VEGF. La VEGF se une asimismo con dos moléculas de IgE por molécula de VEGF. Cuando se añadió VEGF humano recombinante con una proporción molar de 2:1 con respecto a los hexámeros IgE:E27, los hexámeros se enlazaron en complejos de un peso molecular superior mediante la interacción IgE:VEGF (figura 5). La región Fc del anticuerpo anti-IgE del complejo inmunitario resultante se une con el FcR con una afinidad superior que cualquier hexámero anti-IgE o anti-IgE:IgE sin formar complejo.

Se contemplan otras formas de complejos moleculares para utilizar en el ensayo del receptor. Los ejemplos que comprenden únicamente una combinación polipéptido que contiene una región Fc : primera molécula diana comprenden una combinación inmunoadhesina : ligando tal como el receptor VEGF (KDR) -inmunoadhesina : VEGF y un anticuerpo biespecífico (BsAb) de longitud completa : primera molécula diana. Un ejemplo adicional de combinación polipéptido que contiene una región Fc : primera molécula diana : segunda molécula diana comprende

una combinación anticuerpo no bloqueador : receptor soluble: ligando tal como un anticuerpo anti-Trk: receptor Trk soluble : neurotrofina (Urfer *et al. J. Biol. Chem.* 273(10):5829-5840 (1998)).

Aparte de su utilización en un ensayo de unión a receptor, los complejos inmunitarios descritos anteriormente tienen otros usos, entre ellos el análisis de la función del polipéptido que contiene la región Fc y la depuración de complejos inmunitarios *in vivo*. Por lo tanto, se puede administrar el complejo inmunitario a un mamífero (por ejemplo, en experimentaciones con animales) y analizar su vida media, etc.

Para determinar la unión con un receptor, un polipéptido que comprende por lo menos el dominio de unión del receptor de interés (por ejemplo, el dominio extracelular de una subunidad α de un FcR) se puede recubrir en fase sólida, tal como una placa de ensayo. Se puede recubrir el dominio de unión del receptor solo o un receptor - proteína de fusión en la placa utilizando procedimientos estándar. Los ejemplos de receptor - proteínas de fusión comprenden el receptor - proteína de fusión glutatión-S-transferasa (GST), receptor - proteína de fusión del dominio de unión de la quitina, receptor - proteína de fusión - hexaHis tag (recubiertos en placas recubiertas de glutatión, quitina y níquel, respectivamente). Alternativamente, se puede recubrir una molécula de captura en la placa de ensayo y utilizarse para unir el receptor - proteína de fusión mediante la parte no receptora de la proteína de fusión. Los ejemplos comprenden anti-hexaHis F(ab')₂ recubierto en la placa de ensayo utilizada para capturar el receptor - fusión de la prolongación hexaHis o el anticuerpo anti-GST recubierto sobre la placa de ensayo utilizada para capturar una fusión receptor-GST. En otras formas de realización, se puede analizar la unión con células que expresan por lo menos el dominio de unión del receptor. Las células pueden ser células hematopoyéticas naturales que expresan el FcR de interés o se pueden transformar con un ácido nucleico que codifica el FcR o un dominio del mismo de tal modo que el dominio de unión se exprese en la superficie de la célula a analizar.

El complejo inmunitario descrito anteriormente se añade a las placas recubiertas con el receptor y se incuba durante un período suficiente de tiempo de tal modo que el analito se une con el receptor. A continuación se pueden lavar las placas para eliminar los complejos no enlazados y se puede detectar la unión del analito según procedimientos conocidos. Por ejemplo, se puede detectar la unión utilizando un reactivo (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo) que se une específicamente al analito y que se encuentre opcionalmente conjugado con un marcador detectable (los marcadores detectables y los procedimientos para conjugar los mismos con polipéptidos se describirán a continuación en el apartado titulado "Usos no terapéuticos de la variante polipeptídica").

Por una cuestión de comodidad, los reactivos se pueden proporcionar en un kit de ensayo, es decir, una combinación empaquetada de reactivos, para la combinación con el analito del que se pretende analizar la capacidad del analito para unirse a un receptor de interés. Los componentes del kit se proporcionarán generalmente en unas proporciones predeterminadas. El kit puede proporcionar la primera molécula diana y/o la segunda molécula diana, opcionalmente formando un complejo entre sí. El kit puede comprender además placas de ensayo recubiertas con el receptor o un dominio de unión del mismo (por ejemplo, el dominio extracelular de la subunidad α de un FcR). Normalmente se proporcionan asimismo en el kit otros reactivos, tales como un anticuerpo que se une específicamente al analito a analizar, marcado directa o indirectamente con un marcador enzimático. Cuando el marcador detectable es una enzima, el kit comprenderá los sustratos y cofactores requeridos por la enzima (por ejemplo, un sustrato precursor que proporciona el cromóforo o fluoróforo detectable). Además, se pueden proporcionar otros aditivos tales como estabilizantes, disoluciones amortiguadoras (por ejemplo, una disolución amortiguadora de lisis de ensayo y/o lavado) y similares. Pueden variar ampliamente las cantidades relativas de los diversos reactivos para proporcionar unas concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, generalmente liofilizados, comprendiendo excipientes que en disolución proporcionarán una disolución del reactivo que presenta la concentración apropiada. El kit comprende asimismo convenientemente las instrucciones para realizar el ensayo.

B.Preparación de anticuerpos

En la forma de realización preferida de la presente invención, el polipéptido que contiene la región Fc que se ha modificado según las instrucciones de la presente memoria es un anticuerpo. A continuación se describirán las técnicas para producir anticuerpos:

(i) Selección y preparación de antígenos

Cuando el polipéptido es un anticuerpo, se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede provocar un beneficio terapéutico en dicho mamífero. Sin embargo, se contemplan asimismo los anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos (tales como antígenos de glucolípidos asociados a un tumor; véase la patente US n. 5.091.178).

Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (por ejemplo, un receptor) o ligando tal como un factor de crecimiento. Los ejemplos de antígenos comprenden moléculas tales como la renina; una hormona del crecimiento, comprendiendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; el factor de liberación de la hormona de crecimiento; la hormona paratiroidea; la tirotropina; lipoproteínas; la α -I-antitripsina; la cadena A de la insulina; cadena B de la insulina; la proinsulina; la folitropina; calcitonina; la lutotropina; el glucagón; factores de coagulación tales como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular y el factor von Willebrands; factores anticoagulantes como la Proteína C; factor natriurético atrial; un tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como la uroquinasa o activador del plasminógeno de la orina o de tipo tisular humano (t-PA); la bombesina; trombina; el factor del crecimiento hematopoyético; los factores α y β de la necrosis tumoral; la encefalina; RANTES (regulado en la activación de los linfocitos T expresados y secretados normalmente); la proteína inflamatoria de los macrófagos humanos (MIP-1- α); una seroalbúmina tal como la seroalbúmina humana; la sustancia inhibidora de Müller; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorrelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina murina; una proteína microbiana, tal como la β -lactamasa; la DNasa; la IgE; un antígeno asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA), tales como el CTLA-4; la inhibina; la activina; el factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; la proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo tal como el factor neurótrofo procedente del hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5, -6 o (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso tal como el NGF- β ; el factor de crecimiento procedente de los trombocitos (PDGF); un factor de crecimiento de los fibroblastos tal como aFGF y bFGF; el factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , comprendiendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; el factor de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I, proteínas de unión del factor de crecimiento insulinoide (IGF-I de cerebro); proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; la eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como el interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (ILS), por ejemplo, IL-1 a IL-10; la superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de superficie de membrana; factor de aceleración de la descomposición; un antígeno vírico tal como, por ejemplo, una parte de la cubierta del SIDA; proteínas de transporte; receptores de asentamiento; adresinas; proteínas reguladoras; integrinas tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor tal como los receptores HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos indicados anteriormente.

Las dianas moleculares preferidas para los anticuerpos según la presente invención comprenden proteínas CD tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores ErbB tales como el receptor de EGF, los receptores HER2, HER3 o HER4, moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM y la integrina α v/ β 3 que comprenden las subunidades α o β de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento tales como VEGF; IgE; antígenos de grupos sanguíneos; el receptor flk2/FLT3; el receptor de la obesidad (OB); el receptor *mpf*; CTLA-4; la proteína C, etc.

Se pueden utilizar antígenos o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas solubles, como inmunógenos para generar anticuerpos. En el caso de las moléculas transmembrana, tales como receptores, se pueden utilizar fragmentos de las mismas (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. Alternativamente, se pueden utilizar las células que expresan la molécula transmembrana como inmunógeno. Dichas células se pueden obtener de una fuente natural (por ejemplo, estirpes de células cancerosas) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembrana. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos resultarán evidentes para los expertos en la materia.

(ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se obtienen preferentemente en animales mediante una pluralidad e inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno correspondiente y un aditivo. Puede resultar útil conjugar el antígeno correspondiente con una proteína que sea inmunógena en la especie a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de lapa, la seroalbúmina, la tiroglobulina bovina o el inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación mediante aminoácidos cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante aminoácidos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}'\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R' son grupos alquilo distintos.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunógenos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de aditivo completo de Freund e inyectando la disolución por vía intradérmica en una pluralidad de sitios. Al cabo de un mes se administra a los animales una vacuna de recuerdo con entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en aditivo completo de Freund mediante inyección subcutánea en una pluralidad de sitios. Entre 7 y 14 días más tarde se procede a la sangría de los animales y se analiza el suero para con respecto al valor de anticuerpos. Se administran vacunas de recuerdo a los animales hasta que se estabiliza el valor. Preferentemente, se estimula el animal con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína distinta y/o con un

reactivo de reticulación diferente. Se pueden realizar asimismo los conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones proteicas. Asimismo, se utilizan convenientemente sustancias de agregación, tales como alumbre para mejorar la respuesta inmunitaria.

5 (iii) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), o se pueden realizar mediante procedimientos de ADN recombinante (patente US n. 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster o un macaco, se inmuniza tal como se ha descrito anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando una sustancia de fusión apta, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* ["Anticuerpos monoclonales. Principios y práctica"], p. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Se siembran las células de hibridoma preparadas de este modo y se multiplican en un medio de cultivo apto que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales sin fusionar. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas comprenderá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan una producción de anticuerpos de alto nivel estable por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre ellas, las estirpes celulares de mieloma preferidas son estirpes de mieloma murino, tales como las obtenidas a partir de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, California EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles en la *American Type Culture Collection*, Rockville, Maryland EE.UU.. Las estirpes celulares de mieloma humano y de heteromieloma murino - humano se han descrito también para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* ["Técnicas y aplicaciones en la producción de anticuerpos monoclonales"], p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

El medio de cultivo en el que se multiplican las células de hibridoma se analiza con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoanálisis (RIA) o una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

Una vez se han identificado las células de hibridoma que producen los anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad pretendidas, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitante y cultivo mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* ["Anticuerpos monoclonales. Principios y práctica"], p. 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo aptos para este propósito comprenden, por ejemplo, los medios D-MEM o RPMI-1640. Además, se puede multiplicar las células de hibridoma *in vivo* como tumores de ascitis en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, la proteína A-agarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencía fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos con capacidad para unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión, que a continuación se someten a transfección en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que, de otro modo no producen la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. La producción recombinante de anticuerpos se describirá en más detalladamente a continuación.

En una forma de realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de genotecas de fagos de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el

aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando genotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de alta afinidad (escala nM) de anticuerpos humanos mediante la mezcla aleatoria de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como estrategia para la construcción de genotecas muy grandes de fagos. (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). De este modo, dichas técnicas constituyen alternativas viables a las técnicas de hibridomas de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN se puede modificar asimismo, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente US n. 4.816.567; Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante el enlace covalente de la secuencia codificante de la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina.

Normalmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación con un antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con un antígeno que presenta especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con un antígeno que presenta especificidad para un antígeno distinto.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Un anticuerpo humanizado presenta uno o más aminoácidos introducidos en el mismo procedente de una fuente que es no humana. Dichos aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como aminoácidos "importados", que por lo general proceden de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar sustancialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo unas CDR de roedor o unas secuencias CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente US nº 4.816.567) en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son sustancialmente anticuerpos humanos en los que algunos aminoácidos de CDR y posiblemente algunos aminoácidos de FR se sustituyen por aminoácidos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, de cadena ligera o pesada, para utilizarse en la creación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la capacidad antigénica. Según el denominado procedimiento del "best-fit [mejor ajuste]", se selecciona la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor con respecto a toda la genoteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación se acepta la secuencia humana más próxima a la del roedor como marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento utiliza un marco particular procedente de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede utilizar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados distintos (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Además, es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la afinidad elevada hacia el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar dicho objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran normalmente disponibles y resultan familiares para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. El examen de dichas imágenes permite el análisis del papel probable de los aminoácidos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de aminoácidos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar y combinar los aminoácidos del FR a partir de las secuencias receptoras y de importación de tal modo que se alcanza la característica pretendida del anticuerpo, tal como una mayor afinidad hacia el/los antígeno(s) diana. En general, los aminoácidos de CDR se encuentran directamente y más sustancialmente implicados en influir en la unión con el antígeno.

Alternativamente, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) con la capacidad, tras la inmunización, de producir una gama completa de anticuerpos humanos a falta de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión del anticuerpo de cadena pesada (J_H) en ratones quiméricos y mutantes basados en la línea germinal tiene como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal de la inmunoglobulina humana en dichos ratones mutantes basados en la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véanse,

por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.* *Nature* 355:258 (1992). Se pueden obtener asimismo los anticuerpos humanos de genotecas de expresión de fagos (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Vaughan *et al.* *Nature Biotech* 14:309 (1996)).

(v) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos presentan unas especificidades de unión para por lo menos dos antígenos distintos. Aunque dichas moléculas normalmente se unirán únicamente a dos antígenos (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), anticuerpos con especificidades adicionales tales como anticuerpos triespecíficos quedan comprendidos en esta expresión cuando se utiliza en la presente memoria. Los ejemplos de BsAb comprenden aquellos con un brazo dirigido contra un antígeno de una célula tumoral y el otro brazo dirigido contra una molécula activadora de la citotoxicidad tal como anti-FcγRI/anti-CD15, anti-p185^{HER2}/FcγRIII (CD16), anti-CD3/antilinfocitos B malignos (1D10), anti-CD3/anti-p185^{HER2}, anti-CD3/anti-p97, anti-CD3/anticarcinoma renal, anti-CD3/anti-OVCAR-3, anti-CD3/L-D1 (anticarcinoma de colon), anti-CD3/ antianálogo de la hormona estimulante de los melanocitos, antirreceptor de EGF/anti-CD3, anti-CD3/anti-CAMA1, anti-CD3/anti-CD19, anti-CD3/MoV18, antimolécula de adhesión celular neural (NCAM)/anti-CD3, antiproteína de unión con el folato (FBP)/anti-CD3, antipán antigeno asociado al carcinoma (CMOZ-31)/anti-CD3; BsAb con un brazo que se une específicamente a un antígeno tumoral y un brazo que se une a una toxina tal como antisaporina/ anti-Id-1, anti-/antisaporina, anti-CD7/antisaporina, anti-CD38/ anti saporina, anti-CEA / anticadena A de la ricina, antiinterferón-α (IFN-α)/antiidiotipo de hibridoma, anti-CEA / antialcaloide vinca; BsAb para convertir profármacos activados por enzimas tales como anti-CD30/antifosfatasa alcalina (que cataliza la conversión del profármaco de fosfato de mitomicina en alcohol de mitomicina); BsAb que se pueden utilizar como agentes fibrinolíticos tales como antifibrina/ antiactivador del plasminógeno tisular (tPA), antifibrina/ antiactivador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA); BsAbs para dirigir complejos inmunitarios hacia receptores de superficie celular tales como antilipoproteínas de baja densidad (LDL)/antirreceptor Fc (por ejemplo FcγRI, FcγRII o FcγRIII); BsAb para utilizar en el tratamiento de enfermedades infecciosas tales como anti-CD3/antivirus del herpes simple (HSV), antirreceptor de los linfocitos T:complejo CD3/antigripe, anti-FcγR/anti-VIH; BsAb para la detección de tumores *in vitro* o *in vivo* tales como anti-CEA/anti-EOTUBE, anti-CEA/anti-DPTA, anti-p185^{HER2}/antihapteno; BsAb como aditivos de vacunas; y BsAb como herramientas de diagnóstico tales como anti-IgG de conejo/anti-ferritina, antiperoxidasa de rábano (HRP)/antihormona, antisomatostatina/antisustancia P, anti-HRP/anti-FITC, anti-CEA/anti-β-galactosidasa. Los ejemplos de anticuerpos triespecíficos comprenden anti-CD3/anti-CD4/anti-CD37, anti-CD3/anti-CD5/anti-CD37 y anti-CD3/anti-CD8/anti-CD37. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, F(ab')₂ de anticuerpos biespecíficos).

Los procedimientos para crear anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de pares de cadena pesada - cadena ligera de dos inmunoglobulinas, presentando las dos cadenas unas especificidades distintas (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, dichos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas distintas de anticuerpos, de las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, resulta bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se describen unos procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Según un método distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión pretendidas (sitios de combinación anticuerpo - antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, las regiones CH2 y CH3. Se prefiere disponer de una primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión con la cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se pretende de este modo, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se introducen en vectores de expresión separados y se someten conjuntamente a transfección en un organismo hospedador apto. Ello proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en las formas de realización en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan unos rendimientos óptimos. Sin embargo, resulta posible introducir las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales proporciona unos rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

En una forma de realización preferida de este método, los anticuerpos biespecíficos comprenden una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada - cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que dicha estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico pretendido de

las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no pretendidas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este método se da a conocer en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Según otro método descrito en el documento WO96/27011, se puede diseñar la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño idéntico o similar al de la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales grandes de aminoácidos con otras más pequeñas (por ejemplo alanina o treonina). Ello proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de los heterodímeros con respecto a otros productos finales no pretendidos, tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos comprenden anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar con la avidina y el otro con la biotina. Se han propuesto dichos anticuerpos para, por ejemplo, dirigir células del sistema inmunitario hacia células no pretendidas (patente US n. 4.676.980), y en el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden crear anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier procedimiento de reticulación apto. Resultan muy conocidos en la técnica los agentes reticulante aptos y se describen en la patente US n. 4.676.980, junto con diversas técnicas de reticulación.

Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

Aunque el polipéptido de interés de la presente memoria es preferentemente un anticuerpo, se contemplan otros polipéptidos que contienen una región Fc que se puede modificar según los procedimientos descritos en la presente memoria. Un ejemplo de dichas moléculas es una inmuno adhesina.

C. Preparación de la inmuno adhesina

El diseño más simple y directo de la inmuno adhesina combina el/los dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Habitualmente, cuando se preparan las inmuno adhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará de un modo carboxiterminal con el ácido nucleico que codifica la parte aminoterminal de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina, sin embargo, son asimismo posibles las fusiones aminoterminales.

Normalmente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado conservará por lo menos la bisagra, los dominios C_H2 y C_H3 de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina funcionalmente activos. Se realizan asimismo fusiones carboxiterminales de la parte Fc de un dominio constante o inmediatamente aminoterminales con respecto al C_H1 de la cadena pesada o de la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; resultan muy conocidos algunos sitios particulares y se pueden seleccionar a fin de optimizar las características de actividad biológica, secreción o unión de la inmuno adhesina.

En una forma de realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona con la parte aminoterminal de la región Fc de la inmunoglobulina G₁(IgG₁). Se puede fusionar la región constante de la cadena pesada con la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferentemente, se utiliza en la fusión una secuencia que se inicia en la región bisagra justo secuencia arriba con respecto al sitio de escisión de la papaína que define químicamente el Fc de la IgG (es decir, el aminoácido 216, considerando el primer aminoácido de la región constante de la cadena pesada como el 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una forma realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de la adhesina se fusiona con (a) la región bisagra y C_H2 y C_H3 o (b) los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3, de una cadena pesada de IgG.

En el caso de las inmuno adhesinas biespecíficas, las inmuno adhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterotetrámeros heterodímeros. Generalmente, dichas inmunoglobulinas ensambladas presentarán unas estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen la IgG, la IgD y la IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más elevado; la IgM existe generalmente como un pentámero de cuatro unidades básicas que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, pueden existir asimismo en forma multimérica en el suero. En el caso de un multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser la misma o distinta.

A continuación se muestra la representación esquemática de varios ejemplos de inmunoadhesinas ensambladas comprendidas en el alcance de la presente invención:

- 5 (a) AC_L-AC_L ;
 (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, \text{ o } V_LC_L-AC_H)$;
 (c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{ o } V_LC_L-V_HC_H)$
 (d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H, \text{ o } AC_L-V_HC_H, \text{ o } V_LC_L-AC_H)$;
 (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, \text{ o } V_LC_L-AC_H)$; y
 10 (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$,

en las que cada A representa unas secuencias de aminoácidos de la adhesina idénticas o distintas;

15 V_L es un dominio variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina;
 V_H es un dominio variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina;
 C_L es un dominio constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina;
 C_H es un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina;
 n es un número entero superior a 1;
 Y indica el residuo de un agente reticulante covalente.

20 En aras de la brevedad, las estructuras anteriores muestran únicamente las características clave; no indican la unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, donde la actividad de unión requiera dichos dominios, se deberán construir para que se encuentren en las ubicaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

25 Alternativamente, se pueden introducir secuencias de adhesina entre las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, de tal modo que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta forma de realización, las secuencias de adhesina se fusionan con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre la bisagra y el dominio C_{H2} como entre los dominios C_{H2} y C_{H3} . Se han publicado unas construcciones similares en Hoogenboom, *et al.*, *Mol. Immunol.* 28:1027-1037 (1991).

35 Aunque no se requiere la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en las inmunoadhesinas de la presente invención, se podría encontrar una cadena ligera de inmunoglobulina, tanto unida mediante enlace covalente a un polipéptido de fusión adhesina - cadena pesada de inmunoglobulina como fusionada directamente con la adhesina. En el primer caso, normalmente el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se expresa conjuntamente con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina - cadena pesada de inmunoglobulina. Con la secreción, la cadena pesada híbrida y la cadena ligera se unirán mediante enlace covalente para proporcionar una estructura similar a la inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada - cadena ligera de inmunoglobulina enlazadas por puentes disulfuro. Los procedimientos adecuados para preparar dichas estructuras se encuentran, por ejemplo, en la US n. 4.816.567, publicada el 28 de marzo de 1989.

45 Las inmunoadhesinas se construyen más convenientemente mediante la fusión de la secuencia de ADNc que codifica la parte adhesina en trama con una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, se puede utilizar asimismo la fusión con fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véase, por ejemplo Aruffo *et al.*, *Cell* 61:1303-1313 (1990); y Stamenkovic *et al.*, *Cell* 66:1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Se pueden aislar ADNc que codifican regiones constantes de la cadena pesada de IgG basándose en secuencias publicadas procedentes de genotecas de ADNc obtenidas de bazo o de linfocitos de sangre periférica, mediante hibridación o mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se introducen en tándem en un vector plásmido que dirige la expresión eficiente en las células hospedadoras elegidas.

D. Vectores, células hospedadoras y procedimientos de recombinación

55 La presente invención proporciona asimismo un ácido nucleico aislado que codifica una variante polipeptídica tal como se da a conocer en la presente memoria, vectores y células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico, y técnicas de recombinación para la producción de la variante polipeptídica.

60 Para la producción de recombinación de la variante polipeptídica, se aísla el ácido nucleico que lo codifica y se introduce en un vector replicable para su clonación posterior (amplificación del ADN) o para su expresión. El ADN que codifica la variante polipeptídica se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que presentan la capacidad de unirse específicamente a genes que codifican la variante polipeptídica). Se encuentran disponibles muchos vectores. Los componentes del vector comprenden generalmente, pero sin limitarse a los mismos, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un

origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

(i) *Componente secuencia señal*

La variante polipeptídica de la presente invención se puede producir por recombinación no solo directamente sino asimismo como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que presenta un sitio de escisión específico en el extremo aminoterminal de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que la célula hospedador reconoce y procesa (es decir, la escinde mediante una peptidasa señal). En el caso de las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan la secuencia señal variante del polipéptido natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp o una secuencia guía de la enterotoxina termoestable II. En el caso de la secreción en levaduras, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, mediante la secuencia guía de la invertasa de la levadura, la secuencia guía del factor α (entre ellas las secuencias guía de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia guía de la fosfatasa ácida, la secuencia guía de la glucoamilasa de *C. albicans*, o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión de células de mamífero, se dispone de las secuencias señal de los mamíferos así como las secuencias guía de secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple

El ADN para dicha región precursora se liga en marco de lectura al ADN que codifica la variante polipeptídica.

(ii) *Origen del componente de replicación*

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Generalmente, en los vectores de clonación dicha secuencia es una que permite que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico de la hospedadora y comprende los orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Resultan muy conocidas dichas secuencias para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apto para la mayoría de bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es apto para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) resultan útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, no se necesita el origen del componente de replicación para los vectores de expresión de mamíferos (el origen SV40 normalmente se puede utilizar únicamente porque contiene el promotor inicial).

(iii) *Componente del gen de selección*

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, denominado asimismo marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) proporcionan resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener la multiplicación de una célula hospedadora. Aquellas células que se transforman satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que proporciona resistencia al fármaco y, por lo tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables aptos para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico variante del polipéptido, tales como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primates, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR se identifican en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de la DHFR. Una célula hospedadora apta cuando se emplea la DHFR natural es la estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de la DHFR.

Alternativamente, se pueden seleccionar células hospedadoras (en particular hospedadoras naturales que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican la variante polipeptídica, la proteína DHFR natural y otro marcador seleccionable tal como la aminoglicósido-3'-fosfotransferasa (APH) con respecto a una multiplicación celular en un medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente US n. 4.965.199.

Un gen de selección apto para utilizar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de multiplicarse en triptófano, por ejemplo, la ATCC n. 44.076 o la PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de la levadura proporciona de este modo un entorno efectivo para detectar la transformación por multiplicación sin triptófano. De un modo similar, las cepas de levadura que carecen de *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que presentan el gen *Leu2*.

Además, se pueden utilizar los vectores procedentes del plásmido circular 1,6 de μ m pKD1 en la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Alternativamente, se describió de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). Se han descrito asimismo vectores de expresión multicopia estables para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

(iv) Componente promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que el organismo hospedador reconoce y se une funcionalmente al ácido nucleico de la variante polipeptídica. Los promotores aptos para utilizar con hospedadores procariotas comprenden el promotor *phoA*, los sistemas del promotor de la β -lactamasa y la lactosa, la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (*trp*), y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son aptos otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos contendrán asimismo una secuencia de Shine-Dalgarno (SD) unida funcionalmente al ADN que codifica la variante polipeptídica.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas presentan una región rica en AT ubicada aproximadamente entre 25 y 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra entre 70 y 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas existe una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se introducen de un modo adecuado en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras aptas para utilizar con hospedadores de levadura comprenden los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que presentan la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de multiplicación, son las regiones promotoras de alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas catalíticas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores aptos para utilizar en la expresión de levaduras se describen asimismo en el documento EP 73.657. Los potenciadores de levaduras se utilizan asimismo ventajosamente con promotores de levaduras.

Se controla la transcripción de la variante polipeptídica a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero, por ejemplo, mediante promotores procedentes de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente el virus de los simios 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de la inmunoglobulina, de promotores del choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores iniciales y finales del virus SV40 se obtienen ventajosamente como fragmento de restricción del SV40 que contiene asimismo el origen vírico de la replicación del SV40. El promotor inicial inmediato del citomegalovirus humano se obtiene ventajosamente como fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar el ADN en huéspedes de mamíferos utilizando el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la patente US n. 4.419.446. Una modificación de dicho sistema se describe en la patente de US n. 4.601.978. Véase asimismo Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del interferón β humano en células de ratón bajo el control de un promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple. Alternativamente, se puede utilizar como promotor la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) Componente del elemento potenciador

La transcripción de un ADN que codifica la variante polipeptídica de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta frecuentemente introduciendo una secuencia potenciadora en el vector. Hoy en día se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, se utilizará normalmente un potenciador de un virus de células eucariotas. Sin embargo, se utilizará normalmente un potenciador de un virus de células eucariotas. Los ejemplos comprenden el potenciador del SV40 en el lado final del origen de replicación (pb 100 a 270), el potenciador del promotor inicial de citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado final del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores de la activación de promotores eucariotas. Se puede empalmar el potenciador en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica la variante polipeptídica, pero se encuentra preferentemente en un sitio 5' del promotor.

(vi) *Componente de la terminación de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células eucariotas hospedadoras (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o las células nucleadas de otros organismos pluricelulares) comprenderán asimismo las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias se encuentran disponibles normalmente a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente, 3', sin traducir de los ADN o ADNc eucariotas o víricos. Dichas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica la variante polipeptídica. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión descrito en el mismo.

(vii) *Selección y transformación de células hospedadoras*

Las células hospedadoras aptas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria son las células procariotas, levaduras o células eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas aptos para este propósito comprenden las eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, sí como *Bacilli* tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P que se da a conocer en DD 266,710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un hospedador de clonación *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque resultan aptas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Dichos ejemplos son ilustrativos y no limitativos.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores de clonación o expresión aptos para los vectores que codifica la variante polipeptídica. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan, es el organismo hospedador eucariota utilizado más habitualmente. Sin embargo, se encuentran normalmente disponibles y resultan útiles en la presente invención otros géneros, especies y cepas diversos, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; hospedadores de *Kluyveromyces* tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus* tales como *A. nidulans* y *A. niger*.

Las células hospedadoras aptas para la expresión de la variante polipeptídica glucosilada proceden de organismos pluricelulares. Los ejemplos de células que no proceden de vertebrados comprenden células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las células hospedadoras de insectos permisivas correspondientes procedentes de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Se encuentran a disposición pública diversas cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como virus según la presente invención como, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Se pueden utilizar asimismo como hospedadores cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco.

Sin embargo, han despertado un mayor interés las células procedentes de vertebrados y la multiplicación de células de vertebrados en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de estirpes celulares hospedadoras útiles procedentes de mamíferos son la estirpe CV1 de riñón de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la estirpe embrionaria de riñón humano (293 o 293 células subclonadas para su multiplicación en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); las células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino / -DHFR (CHO, Urlaub *et al.*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de cáncer de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); Células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una estirpe de hepatocarcinoma humano (Hep G2).

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de la variante polipeptídica y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para producir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias pretendidas.

(viii) Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir la variante polipeptídica de la presente invención se pueden cultivar en diversos medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), el Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y el Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM). Sigma) son aptos para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes US n. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; se pueden utilizar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de dichos medios se puede enriquecer según sea necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor del crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), disoluciones amortiguadoras (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes habitualmente a concentraciones finales en una escala micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Se puede incorporar asimismo cualquier otro complemento necesario en unas concentraciones apropiadas que resultan conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión y resultarán evidentes para los expertos en la materia.

(ix) Purificación de la variante polipeptídica

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, se puede producir intracelularmente la variante polipeptídica, en el espacio periplásmico o secretarse directamente secretado en el medio. Si la variante polipeptídica se produce intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los residuos, tanto procedentes de células hospedadoras como fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *BiolTechnology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En pocas palabras, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), ácido edético y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Se pueden eliminar los restos celulares mediante centrifugación. Cuando la variante polipeptídica se secreta en el medio, los sobrenadantes procedentes de dichos sistemas de expresión, generalmente se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incorporar un inhibidor de la proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incorporar antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes fortuitos.

Se puede purificar la composición de la variante polipeptídica preparada a partir de las células utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier región Fc de la inmunoglobulina que esté presente en la variante polipeptídica. Se puede utilizar la proteína A para purificar variantes polipeptídicas que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ humanas. (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero se encuentran disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estireno-divinil)benceno permiten alcanzar unas velocidades de flujo más rápidas y unos tiempos de procesamiento más cortos que con la agarosa. Cuando la variante polipeptídica comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (JT Baker, Phillipsburg, NJ) resulta útil para la purificación. Se encuentran disponibles, en función de la variante polipeptídica a recuperar, otras técnicas para la purificación de proteínas tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía sobre sílice, la cromatografía sobre heparina, la cromatografía sobre SEPHAROSE™ en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), el cromatoforfoque, la SDS-PAGE y la precipitación con sulfato de amonio.

Tras cualquier etapa de purificación preliminar, se pueden someter la mezcla que comprende la variante polipeptídica de interés y los contaminantes a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo utilizando una

disolución amortiguadora de elución a un pH aproximadamente comprendido entre 2,5 y 4,5, realizada preferentemente a unas concentraciones bajas de sal (por ejemplo, aproximadamente entre 0 y 0,25 M de sal).

E. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de la variante polipeptídica se preparan para su almacenamiento mezclando la variante polipeptídica que presenta el grado de pureza pretendido con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables, (*Remington's Pharmaceutical Sciences* ["Remington. Farmacia."] 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son atóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, y comprenden disoluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, entre ellos ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butil o alcohol bencílico; alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 aminoácidos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como povidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, entre ellos glucosa, manosa, o dextrinas; quelantes tales como ácido edético; glúcidos tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores formadores de sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o macrogol (PEG).

La formulación de la presente invención puede comprender asimismo más de un principio activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Dichas moléculas se encuentran presentes adecuadamente combinadas en unas cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

Los principios activos se pueden disponer asimismo en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, de microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* ["Remington. Farmacia."] 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Ello se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos aptos de preparaciones de liberación sostenida comprenden matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que comprenden la variante polipeptídica, encontrándose dichas matrices en forma de productos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida comprenden poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente US n. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-y-glutamato, etileno acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico y ácido glicólico de ácido y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan las proteínas durante periodos de tiempo más breves. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo, se pueden desnaturizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, con lo que se produce una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la capacidad inmunógena. Se pueden concebir estrategias racionales para la estabilización en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante el intercambio tio-disulfuro, se puede alcanzar la estabilización modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, utilizando aditivos aptos y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

F. Usos no terapéuticos de la variante polipeptídica

La variante polipeptídica de la presente invención se puede utilizar como una sustancia de purificación por afinidad. En dicho proceso, se inmoviliza la variante polipeptídica sobre una fase sólida tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos muy conocidos en la técnica. La variante polipeptídica inmovilizada se pone en contacto con una muestra que contiene el antígeno a purificar y, posteriormente, se lava el soporte con un disolvente apto que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra excepto el antígeno a purificar, que se une a la variante polipeptídica inmovilizada. Por último, se lava el soporte con otro disolvente apto, tal como una disolución amortiguadora de glicina, a un pH de 5,0, que liberará el antígeno de la variante polipeptídica.

La variante polipeptídica puede resultar asimismo útil en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, para detectar la expresión de un antígeno de interés en células, tejidos o suero específicos.

En el caso de las aplicaciones de diagnóstico, la variante polipeptídica se marcará normalmente con una parte detectable. Se encuentran disponibles numerosos marcadores que se pueden agrupar sustancialmente en las categorías siguientes:

(a) Radioisótopos, tales como ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^3H y ^{131}I . Se puede marcar la variante polipeptídica con el radioisótopo utilizando las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2* ["Protocolos actuales en inmunología, volúmenes 1 y 2"], Coligen *et al.*, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991) por ejemplo, y puede medirse la radiactividad utilizando el recuento por centelleo.

(b) Se encuentran disponibles marcadores fluorescentes, tales como quelatos de lantánidos (quelatos de europio) o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, lisamina, ficoeritrina y Texas Red. Se pueden conjugar los marcadores fluorescentes con la variante polipeptídica utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology, supra*. Se puede cuantificar la fluorescencia utilizando un fluorímetro.

(c) Se encuentran disponibles diversos marcadores enzima-sustrato y la patente US n. 4.275.149 examina algunos de los mismos. La enzima cataliza generalmente una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse por espectrometría. Alternativamente, la enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se han descrito anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y a continuación emite luz que se puede medir (utilizando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos comprenden las luciferasas (por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; patente US n. 4.737.456), la luciferina, las 2,3-dihidroftalazinedionas, la malato deshidrogenasa, la ureasa, la peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano (HRPO), la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, las oxidasas de sacáridos (por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), las oxidasas heterocíclicas (tales como la uricasa y la xantina oxidasa), la lactoperoxidasa, la microperoxidasa y similares. Las técnicas para conjugar enzimas con anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay* ["Métodos para la preparación de conjugados enzima-anticuerpo para utilizar en inmunoanálisis enzimático"], en *Methods in Enzym.* (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166 (1981).

Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato comprenden, por ejemplo:

- (i) peroxidasa de rábano (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en la que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de un colorante (por ejemplo, ortofenilendiamina (OPD) o hidrocloreuro de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB));
- (ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y
- (iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

Se encuentran disponibles numerosas combinaciones diversas enzima-sustrato para los expertos en la materia. Para un análisis general de las mismas, véanse las patentes US n. 4.275.149 y 4.318.980.

A veces, se conjuga el marcador indirectamente con la variante polipeptídica. Los expertos en la materia conocen diversas técnicas para realizarlo. Por ejemplo, se puede conjugar la variante polipeptídica con biotina y se puede conjugar cualquiera de las tres amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente con avidina o viceversa. La biotina se une selectivamente con la avidina y, por lo tanto, se puede conjugar el marcador con la variante polipeptídica de este modo indirecto. Alternativamente, para realizar la conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica, se conjuga la variante polipeptídica con un pequeño hapteno (por ejemplo, digoxina) y se conjuga uno de los distintos tipos de marcadores mencionados anteriormente con una variante polipeptídica antihapteno (por ejemplo, un anticuerpo antidigoxina). Por lo tanto, se puede realizar la conjugación indirecta del marcador con la variante polipeptídica.

En otra forma de realización de presente la invención, no resulta necesario marcar la variante polipeptídica y se puede detectar la presencia de la misma utilizando un anticuerpo marcado que se une con la variante polipeptídica.

Puede emplearse la variante polipeptídica de la presente invención en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tales como los ensayos de unión competitiva, los ensayos de intercalación directa e indirecta, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* ["Anticuerpos monoclonales: Manual de Técnicas"], p.147-158 (CRC Press, Inc. 1987).

Se puede utilizar asimismo la variante polipeptídica en ensayos de diagnóstico *in vivo*. Generalmente, se marca la variante polipeptídica con un radionúclido (tal como ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C , ^{131}I , ^{125}I , ^3H , ^{32}P o ^{35}S), de tal modo que el antígeno o células las que expresan el mismo se pueden localizar mediante immunoescintigrafía.

5

G. Usos *in vivo* de la variante polipeptídica

Se contempla que se pueda utilizar la variante polipeptídica de la presente invención para tratar un mamífero por ejemplo, un paciente que padece una enfermedad o trastorno que podría beneficiarse de la administración de la variante polipeptídica. Las enfermedades que se pueden tratar con la variante polipeptídica son muchas e comprenden el cáncer (por ejemplo cuando la variante polipeptídica se une al receptor HER2 o CD20); trastornos alérgicos tales como el asma (con un anticuerpo anti-IgE); y trastornos en los que interviene la LFA (por ejemplo, cuando la variante polipeptídica es un anticuerpo anti-LFA-1 o anti-ICAM-1), etc. Cuando la variante polipeptídica no se une a complemento, pero conserva la capacidad de unión con el FcR, las enfermedades o trastornos ilustrativos a tratar comprenden: el cáncer (por ejemplo, cuando se pretende disponer de la función de la ADCC, pero la activación del complemento provocaría unos efectos secundarios aumentados, tales como vasculitis en los vasos sanguíneos del sitio del tumor); trastornos tratados con un anticuerpo agonista; trastornos en los que la variante polipeptídica se une con un antígeno soluble y la estequiometría produce complejos inmunitarios que activan la cascada del complemento y se obtienen unos efectos secundarios no pretendidos; enfermedades que utilizan un anticuerpo antagonista que modula por disminución la función del receptor sin dañar el tejido o la función del órgano; el tratamiento con inmunoglobulina intravenosa para, por ejemplo, pacientes inmunodeficientes con trastornos autoinmunitarios.

La variante polipeptídica se administra mediante cualquier medio apto, comprendiendo la administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal y, si se pretende para un tratamiento inmunodepresor local, la administración intralesional. Las inyecciones parenterales comprenden la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, la variante polipeptídica se administra adecuadamente mediante infusión por impulsos, en particular con dosis decrecientes de la variante polipeptídica. Preferentemente, las dosis se proporcionan mediante inyecciones, más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es de corta duración o crónica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de la variante polipeptídica dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si la variante polipeptídica se administra con fines preventivos o terapéuticos, tratamiento previo, los antecedentes del paciente y la respuesta a la variante polipeptídica, y de la discreción del médico adjunto. La variante polipeptídica se administra convenientemente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

Dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, aproximadamente entre 1 µg/kg y 15 mg/kg (por ejemplo, entre 0,1 y 20 mg/kg) de variante polipeptídica es una dosis candidata inicial para la administración al paciente tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas como mediante venoclisis continua. Una dosis diaria típica podría variar aproximadamente entre 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, en función de los factores mencionados anteriormente. En el caso de administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que se produce la reducción pretendida de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden resultar útiles otras pautas posológicas. Se realiza fácilmente el seguimiento del progreso de este tratamiento mediante técnicas y ensayos convencionales.

Se formulará, dosificará y administrará la composición de la variante polipeptídica de un modo coherente con las buenas prácticas médicas. Los factores a considerar en este contexto comprenden el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, el estado clínico del paciente, la causa del trastorno, el sitio de administración del fármaco, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La "cantidad terapéuticamente efectiva" de la variante polipeptídica a administrar dependerá de dichas consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para prevenir, mejorar o tratar una enfermedad o trastorno. Aunque no es imprescindible, la variante polipeptídica se puede formular opcionalmente con uno o más fármacos utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros fármacos depende de la cantidad de variante polipeptídica presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento, y de otros factores comentados anteriormente. Estos se utilizan generalmente con las mismas dosis y con las vías de administración indicadas anteriormente en la presente memoria o con aproximadamente entre el 1 y el 99 % de las dosificaciones empleadas hasta ahora.

La presente invención se comprenderá mejor haciendo referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos no deberán considerarse como limitativos del alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

Ensayo de unión con el receptor de baja afinidad

Este ensayo determina la unión de una región Fc de la IgG con las subunidades α recombinantes de Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIIa expresadas como proteínas de fusión marcadas con His6-glutación-S-transferasa (GST). Puesto que la afinidad de la región Fc de la IgG1 hacia la Fc γ RI es de escala nanomolar, se puede determinar la unión de mutantes IgG1 Fc mediante la valoración de la IgG monomérica y la medición de la IgG unida con un anti-IgG policlonal en un formato de prueba ELISA estándar (ejemplo 2 a continuación). La afinidad de los otros miembros de la familia Fc γ R, es decir, Fc γ RIIA, Fc γ RIIb y Fc γ RIIIa hacia la IgG es, sin embargo, de escala micromolar y no se puede medir de un modo fiable la unión de la IgG1 monomérica para dichos receptores en un formato de prueba ELISA.

El siguiente ensayo utiliza mutantes de Fc anti-IgE E27 recombinante (figuras 4A y 4B) que, cuando se mezclan con la IgE humana en una proporción molar 1:1, forman un hexámero estable que consiste en tres moléculas anti-IgE y tres moléculas de IgE. Se diseñó una forma química recombinante de IgE (IgE química) y comprende una región Fc de la IgE humana y la Fab de un anticuerpo anti-VEGF (Presta *et al.* *Cancer Research* 57:4593-4599 (1997)) que une dos moléculas de VEGF por mol de anti-VEGF. Cuando se añadió VEGF humano recombinante con una proporción molar de 2:1 con respecto a los hexámeros IgE:E27, los hexámeros se enlazaron en complejos de un peso molecular superior mediante la interacción Fab:VEGF de la IgE química. El componente E27 de dicho complejo se une a las subunidades α de Fc γ RIIA, Fc γ RIIb y Fc γ RIIIa con mayor afinidad para permitir la detección en un formato de prueba ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recubrimiento de los receptores. Las subunidades α del receptor Fc γ se expresaron como fusiones con GST de dominios extracelulares marcados con His6 (ECD) en 293 células obteniéndose una proteína de fusión de ECD-6His-GST (Graham *et al.* *J. Gen. Virol.* 36:59-72 (1977) y Gorman *et al.* *DNA Prot. Eng. Tech.* 2:3-10 (1990)) y se intercambió la disolución amortiguadora en fosfato salino amortiguado (PBS). Se determinaron las concentraciones por absorción a 280 nm utilizando los coeficientes de extinción obtenidos por análisis de la composición de los aminoácidos. Se recubrieron los receptores sobre placas Nunc Maxisorb F96 (n. cat. 439454) a 100 ng por pocillo añadiendo 100 μ l de la fusión receptor-GST a 1 μ g/ml en PBS y se incubaron durante 48 horas a 4 °C. Antes del ensayo, se lavaron 3 veces las placas con 250 μ l de disolución amortiguadora de lavado (PBS, pH 7,4 que contenía Tween 20™ al 0,5 %) y se bloquearon con 250 μ l de disolución amortiguadora del ensayo (disolución salina amortiguada de Tris 50 mM, Tween 20™ al 0,05 %, albúmina bovina de grado RIA al 0,5 % (Sigma A7888), y ácido edético 2 mM a un pH de 7,4).

Formación de complejos inmunitarios: se añadieron unas cantidades molares iguales (1:1) de E27 y de IgE química recombinante que unió dos moles de VEGF humana recombinante por mol de IgE química a un tubo de polipropileno de 12 x 75 mm en PBS y se mezclaron por rotación durante 30 minutos a 25 °C. Se formaron hexámeros E27 (anti-IgE)/IgE química (IgE) durante dicha incubación. Se añadió la VEGF humana recombinante (forma 165, MW 44.000) con una relación molar 2:1 a la concentración de IgE y se mezcló por rotación durante 30 minutos adicionales a 25 °C. La VEGF - IgE química se unió con los hexámeros E27: IgE química en complejos de un mayor peso molecular que se unieron a las subunidades α del Fc γ R en placas recubiertas del ECD a través de la región Fc del anticuerpo E27.

Se añadieron unos complejos **E27:IgE química:VEGF** (proporción molar 1:1:2) a placas recubiertas con subunidades α de Fc γ R a unas concentraciones de E27 de 5 μ g y 1 μ g de IgG total por cuadruplicado en una disolución amortiguadora de ensayo y se incubaron durante 120 minutos a 25 °C en un agitador orbital.

Detección del complejo: se lavaron las placas 5 veces con disolución amortiguadora de lavado para eliminar los complejos no unidos y se detectó la unión de la IgG añadiendo 100 μ l de peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con la específica de la cadena pesada anti-IgG (γ) humana de cabra (Boehringer Mannheim 1814249) con una proporción 1:10.000 en disolución amortiguadora de ensayo y se incubaron durante 90 min a 25 °C en un agitador orbital. Se lavaron las placas 5 veces con disolución amortiguadora de lavado para eliminar la HRP no unida con el anti-IgG humano de cabra y se detectó el anti-IgG añadiendo 100 μ l de disolución del sustrato (0,4 mg/ml de dihidrocloruro de o-fenilendiamina, Sigma P6912, H₂O₂ 6 mM en PBS) y se incubaron durante 8 min a 25 °C. Se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 4,5 N y se midió el producto colorimétrico a 490 nm en un densímetro de una placa 96 pocillos (Molecular Devices). La unión de complejos de E27 mutante se expresó como el porcentaje del complejo que contenía la E27 natural.

EJEMPLO 2

Identificación de los sitios de unión particulares C1q en un anticuerpo IgG humano

En el presente estudio se identificaron mutaciones del dominio CH2 de un anticuerpo IgG1 humano, "C2B8" (Reff *et al.*, *Blood* 83:435 (1994)), que impide la unión del anticuerpo con el C1q pero no altera la conformación del anticuerpo ni afecta a la unión a cada uno de los FcγR. Mediante mutagénesis de barrido con alanina, se identificaron cinco mutantes de la IgG1 humana, D270K, D270V, K322A P329A y P331, que eran no líticos y habían disminuido la unión con el C1q. Los datos indicaron que los sitios de unión con el núcleo del C1q de la IgG1 humana son distintos a los de la de IgG2b murina. Además, se descubrió que K322A, P329A y P331A se unen normalmente con el antígeno CD20 y con cuatro receptores, FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn.

MATERIALES Y MÉTODOS

Construcción de mutantes C2B8: se utilizaron las cadenas quiméricas ligeras y pesadas del anticuerpo C2B8 anti-CD20 (Reff *et al.*, *Blood* 83:435 (1994)) subclonadas por separado en vectores PRK descritos anteriormente (Gorman *et al.*, *DNA Protein Eng. Tech.* 2:3 (1990)). Se construyeron variantes de exploración de alanina de la región Fc de la cadena pesada por mutagénesis dirigida al sitio (Kunkel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488 (1985)). Se sometieron a cotransfección los plásmidos de las cadenas pesadas y ligeras en una estirpe celular de riñón embrionario humano transformada con adenovirus tal como se ha descrito anteriormente (Werther *et al.*, *J. Immunol.* 157:4986 (1996)). Se cambió el medio a un medio sin suero 24 horas tras la transfección y se recogió el anticuerpo secretado después de cinco días. Se purificaron los anticuerpos utilizando proteína A-SEPHAROSE CL-4B™ (Pharmacia), se intercambiaron la disolución amortiguadora y se concentró hasta 0,5 ml con PBS utilizando un Centricon-30 (Amicon), y se almacenó a 4 °C. Se determinó la concentración del anticuerpo utilizando la prueba ELISA de enlace en la Ig total.

Prueba ELISA de unión con el C1q: se recubrieron placas Costar de 96 pocillos durante la noche a 4 °C con las concentraciones indicadas de C2B8 en una disolución amortiguadora de recubrimiento (disolución amortiguadora de carbonato de sodio 0,05 M), a un pH de 9. A continuación se lavaron las placas 3 veces con PBS/Tween 20™ al 0,05 %, a un pH de 7,4 y se bloquearon con 200 μl de diluyente de la prueba ELISA sin timerosal (NaPO₄ 0,1 M/NaCl 0,1 M/gelatina al 0,1 %/ Tween 20™ al 0,05 %/PROCLIN300 al 0,05 %) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa 3 veces con tampón de lavado, se añadió una cantidad equivalente de 100 μl de 2 mg/ml de C1q (Quidel, San Diego, CA) a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se lavó la placa 6 veces con disolución amortiguadora de lavado. Se añadieron 100 μl de una dilución de 1:1.000 del anticuerpo conjugado con la peroxidasa C1q anti-complemento de oveja (Bioscience) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo la placa 6 veces con una disolución amortiguadora y se añadieron 100 μl de disolución amortiguadora del sustrato (PBS/0,012 % H₂O₂) que contenía OPD (O-fenilendiaminodihidrocloruro (Sigma)) a cada pocillo. La reacción de oxidación, observada por la aparición de un color amarillo, se dejó continuar durante 30 minutos y detenerse mediante la adición de 100 μl de H₂SO₄ 4,5 N. Se leyó la absorbancia (492-405) nm utilizando un lector de microplacas (SPECTRA MAX 250™, Molecular Devices Corp.). Se efectuaron en paralelo los controles apropiados (es decir, se realizó la prueba ELISA sin C1q para cada concentración de C2B8 empleada y se realizó asimismo la prueba ELISA sin C2B8). Para cada mutante, se midió la unión del C1q trazando la absorbancia (492-405) nm con respecto a la concentración de C2B8 en μg/ml utilizando un programa de ajuste de curvas de 4 parámetros (KALEIDAGRAPH™) y comparando los valores de la EC₅₀.

Prueba de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Se realizó esta prueba sustancialmente tal como se ha descrito anteriormente (Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1997)). Se diluyeron diversas concentraciones de C2B8 (0,08 a 20 μg/ml) con disolución amortiguadora RHB (RPMI 1640/HEPES 20 mM (pH 7,2)/glutamina 2 mM/BSA 0,1 %/100 μg/ml de gentamicina). Se diluyó el complemento humano (Quidel) con una proporción 1:3 en disolución amortiguadora RHB y se diluyeron células WIL2-S (disponibles en la ATCC, Manassas, VA) que expresan el antígeno CD20 hasta una densidad de 1 x 10⁶ células/ml con disolución amortiguadora RHB. Se añadieron mezclas de 150 μl que contenían unos volúmenes equivalentes de C2B8, complemento humano diluido y células WIL2-S a una placa de 96 pocillos de cultivo tisular con el fondo plano y se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C y CO₂ al 5 % para facilitar la lisis en la que interviene el complemento celular. A continuación se añadieron 50 μl de azul de alamar (Accumed International) a cada pocillo y se incubaron durante la noche a 37 °C. Se midió la absorbancia utilizando un fluorómetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Tal como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, los resultados se expresaron en unidades de fluorescencia relativa (RFU). Se calcularon las concentraciones de la muestra a partir de una curva estándar C2B8 y se indicó el porcentaje de actividad como la comparación con el C2B8 natural para cada mutante.

Potencia de unión con el CD20 de los mutantes C2B8: se analizó la unión de C2B8 y mutantes con el antígeno CD20 mediante un método descrito previamente (Reff *et al.*, (1994), *supra*; analizado en Gazzano-Santoro *et al.*, (1996), *supra*). Se cultivaron células WIL2-S durante 3 a 4 días con una densidad celular de 1 x 10⁶ células/ml. Se lavaron y se centrifugaron las células dos veces en disolución amortiguadora FACS (PBS/BSA al 0,1 %/ Na₂SO₄ 0,02 %) y se volvieron a suspender hasta una densidad celular de 5 x 10⁶ células/ml. Se añadieron 200 μl de células (5 x 10⁶ células/ml) y 20 μl de muestras de C2B8 diluidas a un tubo de 5 ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. A continuación, se lavó la mezcla con 2 ml de disolución amortiguadora de FACS fría, se centrifugaron y se volvieron a suspender en 200 μl de disolución amortiguadora de FACS fría. Se añadieron

10 μ l de anti-IgG humana de cabra - FITC (American Qualex Labs.) a la suspensión y se incubó la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Tras la incubación, se lavó la mezcla con 2 ml de disolución amortiguadora FACS, se centrifugó y se volvió a suspender en 1 ml de disolución amortiguadora fijadora fría (formaldehído al 1 % en PBS). Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo y se expresaron los resultados como unidades de fluorescencia relativa (RFU), se representaron con respecto a las concentraciones de anticuerpos utilizando un programa de ajuste de curvas de 4 parámetros (KALEIDAGRAPH™). Los valores de la EC₅₀ se presentaron como un porcentaje de la del material de referencia de los C2B8.

Pruebas ELISA de unión con el Fc γ R: Se recubrió la fusión de la subunidad α del Fc γ RI-GST sobre placas Nunc Maxisorb F96 (n. cat. 439454) a 100 μ l de la fusión receptor-GST a 1 μ g/ml en PBS y se incubaron durante 48 horas a 4 °C. Antes del ensayo, se lavaron 3 veces las placas con 250 μ l de disolución amortiguadora de lavado (PBS, pH 7,4 que contenía Tween 20™ al 0,5 %) y se bloquearon con 250 μ l de disolución amortiguadora del ensayo (disolución salina amortiguada de Tris 50 mM, Tween 20™ al 0,05 %, albúmina bovina de grado RIA al 0,5 % (Sigma A7888), y ácido edético 2 mM a un pH de 7,4). Se añadieron las muestras diluidas hasta 10 μ g/ml en 1 ml de disolución amortiguadora de ensayo a placas recubiertas por las subunidades α de Fc γ RI y se incubaron durante 120 minutos a 25 °C en un agitador orbital. Se lavaron las placas 5 veces con disolución amortiguadora de lavado para eliminar los complejos no unidos y se detectó la unión de la IgG añadiendo 100 μ l de peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con la específica de la cadena pesada anti-IgG (γ) humana de cabra (Boehringer Mannheim 1814249) con una proporción 1:10.000 en disolución amortiguadora de ensayo y se incubaron durante 90 min a 25 °C en un agitador orbital. Se lavaron las placas 5 veces con disolución amortiguadora de lavado para eliminar la HRP no unida con el anti-IgG humano de cabra y se detectó el anti-IgG añadiendo 100 μ l de disolución del sustrato (0,4 mg/ml de dihidrocloruro de o-fenilendiamina, Sigma P6912, H₂O₂ 6 mM en PBS) y se incubaron durante 8 min a 25 °C. Se detuvo la reacción enzimática añadiendo 100 μ l de H₂SO₄ 4,5 N y se midió el producto colorimétrico a 490 nm en un densímetro de una placa 96 pocillos (Molecular Devices). La unión de la variante se expresó como el porcentaje de la molécula natural.

Las pruebas ELISA de unión de los Fc γ RII y III se realizaron tal como se ha descrito en el ejemplo 1 anterior.

Para medir la actividad de unión al FcRn de las variantes de IgG, se recubrieron las placas de la prueba ELISA con 2 μ g/ml de estreptavidina (Zymed, South San Francisco) en 50 mM de disolución amortiguadora de carbonato, a un pH de 9,6, a 4 °C durante la noche y se bloquearon con PBS-BSA al 0,5 %, a un pH de 7,2 a temperatura ambiente durante una hora. Se añadió FcRn biotinilado (preparado utilizando biotina-X-NHS de Research Organics, Cleveland, OH y utilizado a 1-2 μ g/ml) en PBS-BSA al 0,5 %, de polisorbato 20 al 0,05 %, a un pH de 7,2, a la placa y se incubó durante una hora. Se añadieron dos diluciones seriadas dobles de IgG estándar (1,6 a 100 ng/ml) o variantes en PBS-BSA al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, a un pH de 6,0, a la placa y se incubaron durante dos horas. Se detectó la IgG unida utilizando F(ab')₂ de cabra IgG anti-humana F(ab')₂ marcada con peroxidasa en la disolución amortiguadora al pH de 6,0 anterior (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) seguido de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Kirgaard & Perry Laboratories) como sustrato. Se lavaron las placas entre las etapas con PBS-BSA al 0,5 %, polisorbato 20 al 0,05 %, a un pH de 7,2 o de 6,0. Se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Vmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA). Se ajustaron las curvas de valoración mediante una regresión no lineal de cuatro parámetros con un programa de ajuste de curvas (KaleidaGraph, Synergy Software, Reading, PA). Se calcularon las concentraciones de las variantes de IgG correspondientes a la absorbancia del punto medio de la curva de valoración de la normal y a continuación se dividieron por la concentración de la normal correspondiente a la absorbancia del punto medio de la curva de valoración normal.

RESULTADOS Y COMENTARIO

Por mutagénesis de barrido de alanina, se construyeron diversas mutaciones de un solo punto en el dominio CH2 del C2B8, empezando con E318A, K320A y K322A. Todos los mutantes construidos se enlazaron normalmente con el antígeno CD20 (Tabla 1).

Tabla 1

	natural	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
FcRn	+	+	+	+		
CD20	+	+	+	+	+	+
FcγRI	+	+	+	+	+	+
FcγRII	+	+	+	+	+	+
FcγRIII	+	+	+	+	+	+
*C1q	+++	++	+++	-	-	-
CDC	+	+	+	-	-	-
(+) Indica unión y (-) significa que no se ha producido unión * Con respecto a la unión del C1q, cada signo + es equivalente a aproximadamente un 33 % de unión.						

Cuando se analizó la unión del complemento humano a un anticuerpo con un Fc humano, la capacidad de E318A y K320A para activar el complemento resultó sustancialmente idéntica a la de tipo natural C2B8 (Tabla 1). Cuando se comparó con el C2B8 de tipo natural, se obtuvo poca diferencia en la unión de E318A y K320A con el C1q. Únicamente se produce una disminución del 10 % en la unión de K320A y aproximadamente una disminución del 30 % en la unión de E318A con el C1q (figura 2). Los resultados indican que el efecto de la sustitución del E318A y el K320A en la activación del complemento y la unión con el C1q es mínimo. Además, se sustituyó la IgG1 humana del C2B8 por IgG2 humana y se utilizó como control negativo en los estudios de la unión con el C1q. El mutante IgG2 parece presentar una afinidad muy inferior hacia el C1q que los mutantes E318A y K320A (figura 2). Por lo tanto, los resultados demuestran que E318 y K320 no constituyen el núcleo de los sitios de unión de la IgG1 humana con el C1q. En cambio, la sustitución del K322A tuvo un efecto significativo tanto en la actividad del complemento como en la unión con el C1q. El mutante K322A no presenta actividad CDC cuando se analizó en el ensayo de la CDC anterior y era más que un 100 veces inferior la del C2B8 natural en la unión con el C1q (figura 2). En el sistema humano, el K322 es la única parte del núcleo de los sitios de unión con el C1q propuestos que parecían tener un efecto significativo sobre la activación del complemento y la unión con el C1q.

Puesto que el estudio Duncan y Winter se realizó utilizando IgG2b de ratón y los resultados anteriores ponen de manifiesto que K320 y E318 en la IgG1 humana no se encuentran implicados en la unión con el C1q, y sin ligarse a ninguna teoría, los datos anteriores indican que la región de unión con el C1q en la IgG murina es distinta de la de la humana. Para investigar más a fondo y asimismo identificar mutantes adicionales que no se unen con el C1q y, por lo tanto, no activar el complemento, se construyeron más mutaciones puntuales diversas en la proximidad de K322, tal como se analizó a partir de la estructura tridimensional del C2B8 Fc. Se analizaron los mutantes construidos K274A, N276A, Y278A, S324A, P329A, P331A, K334A, y T335A, con respecto a su capacidad para unirse con el C1q y asimismo activar el complemento. Muchas de dichas sustituciones tuvieron poco o ningún efecto en la unión con C1q o la activación del complemento. En los ensayos anteriores, los mutantes P329A y P331A no activaron el complemento y presentaron un nivel inferior de unión con el C1q. El mutante P331A no activó el complemento y resultó 60 veces inferior en la unión con el C1q (figura 3) en comparación con el C2B8 natural (figura 2). El intervalo de concentración de las variantes de anticuerpos utilizados en la figura 3 se extiende hasta 100 µg/ml a fin de observar la saturación de la unión del C1q con la variante P331A. La mutación P329A produce en un anticuerpo que no activa el complemento y es más de 100 veces inferior en el nivel de unión con el C1q (figura 3) que el C2B8 natural (figura 2).

Se examinaron los mutantes que no se unen con el C1q y, por lo tanto, no activan el complemento con respecto a su capacidad para unirse con los receptores Fc: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa y FcRn. Este estudio en particular se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgE humanizado, un anticuerpo IgG1 con estas mutaciones (véase el ejemplo 1 anterior). Los resultados indicaron que los mutantes K322A y P329A se unen a todos los receptores del Fc en la misma medida que la proteína natural (Tabla 2). Sin embargo, se produce una ligera disminución en la unión del P331A con el FcγRIIb.

En resumen, se identificó que dos sustituciones de aminoácidos en la región carboxiterminal del dominio CH2 de la IgG1 humana, K322A y P329A provocaban un nivel de unión con el C1q más de 100 veces inferior y no activaban la vía de la CDC. Dichos dos mutantes, K322A y P329A, se unen a todos los receptores Fc con la misma afinidad que el anticuerpo natural. Basándose en los resultados, resumidos en la Tabla 2, y sin ligarse a ninguna teoría, se propone que el epicentro de unión del C1q de la IgG1 humana se centra alrededor de K322, P329 y P331 y es distinto del epicentro IgG2b murino que constituye E318, K320 y K322.

Tabla 2

	natural	E318A	K320A	K322A	P329A	P331A
CD20	100	89	102	86	112	103
^a FcγRI	100	93	102	90	104	74
^a FcγRIIa	100	113	94	109	111	86
^a FcγRIIb	100	106	83	101	96	58
^a FcγRIII	100	104	72	90	85	73
CDC	100	108	108	ninguno	ninguno	ninguno
^a En el caso de una unión con los FcγR, se realizaron los mutantes en el fondo E27 (anti-IgE). Los resultados se presentan como porcentaje de la del tipo natural.						

Se identificó otro aminoácido implicado en la unión con el C1q humano utilizando los procedimientos descritos en el presente ejemplo. El aminoácido D270 se sustituye con lisina y valina para generar los mutantes D270K y D270V, respectivamente. Ambos mutantes presentaron una disminución en la unión con el C1q humano (figura 6) y eran no líticos (figura 7). Los dos mutantes se enlazan normalmente con el antígeno CD20 e incorporan la ADCC.

EJEMPLO 3

Mutantes con una mejor unión con el C1q

El estudio siguiente demuestra que la sustitución de aminoácidos en las posiciones K326, A327, E333 y K334 produjo unos mutantes con un aumento de por lo menos aproximadamente un 30% en la unión con el C1q en comparación con el anticuerpo natural. Ello indicó que K326, A327, E333 y K334 son sitios potenciales para la mejora de la eficacia de los anticuerpos mediante la vía de la CDC. El objetivo de este estudio fue mejorar la actividad de un anticuerpo con respecto a la CDC aumentando la unión con el C1q. Se construyeron diversos mutantes por mutagénesis dirigida en K326 y E333, obteniéndose un aumento en la unión con el C1q. Los aminoácidos ordenados según el aumento de la unión en K326 son K<V<E<A<G<D<M<W y los aminoácidos ordenados según el aumento de la unión en E333 son E<Q<D<V<G<A<S. Se construyeron cuatro mutantes, K326M, K326D, K326E y E333S con por lo menos un aumento de dos veces en la unión con el C1q en comparación con el tipo natural. El mutante K326W presentó un aumento de cinco veces en la unión con el C1q.

Se prepararon mutantes del anticuerpo C2B8 natural tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. Se incorporó un anticuerpo de control adicional, el C2B8 natural producido en células de ovario de hámster chino (CHO) sustancialmente tal como se describe en la patente US n. 5.736.137, en una prueba ELISA de unión con el C1q para confirmar que el C2B8 natural producido en la estirpe celular de riñón 293 presentaba la misma actividad de unión con el C1q que el anticuerpo producido por las CHO (véase "CHO-wt-C2B8" en la figura 8). Se realizaron en este ejemplo la prueba ELISA de unión con el C1q, el ensayo sobre la CDC y el ensayo sobre la potencia de enlace con el CD20 tal como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior.

Tal como se representa en la figura 8, la sustitución de la alanina en K326 y E333 en C2B8 produjo unos mutantes con aproximadamente un aumento del 30% en la unión con el C1q.

Se construyeron otros mutantes diversos de un solo punto en K326 y E333 y se analizaron con respecto a su capacidad para unirse con el C1q y activar el complemento. Todos los mutantes construidos se enlazaron normalmente con el antígeno CD20.

Con respecto al K326, los otros mutantes de un solo punto construidos fueron K326A, K326D, K326E, K326G, K326V, K326M y K326W. Tal como se representa en la figura 9, todos estos mutantes se unieron con el C1q con una mejor afinidad que el anticuerpo natural. K326W, K326M, K326D y K326E presentaron un aumento de por lo menos dos veces en la unión con el C1q (Tabla 3). Entre los mutantes K326, K326W presentaba la mejor afinidad hacia el C1q.

Tabla 3

Mutante	Valor EC ₅₀
Natural	1,53
K326V	1,30
K326A	1,03
K326E	1,08
K326G	0,95
K326D	0,76
K326M	0,67
K326W	0,47
E333S	0,81
E333A	0,98
E333G	1,14
E333V	1,18
E333D	1,22
E333Q	1,52
K334A	1,07

Las sustituciones con aminoácidos hidrófobos, así como con aminoácidos cargados, produjeron unos mutantes con un aumento de la unión con el C1q. Incluso la sustitución con glicina, de la que se conoce que proporciona flexibilidad a una cadena y se encuentra bien conservada en la naturaleza, produjo un mutante con una mayor afinidad hacia C1q en comparación con el tipo natural. Parece que cualquier sustitución de aminoácidos en este sitio produciría un mutante con mayor afinidad hacia el C1q. Según el análisis de la estructura tridimensional, K326 y E333 se encuentran en la proximidad del núcleo de los sitios de unión con el C1q (figura 10).

Además de la alanina, se sustituyó asimismo E333 con otros aminoácidos. Todos estos mutantes, E333S, E333G, E333V, E333D y E333Q, habían aumentado la unión con el C1q en comparación con el tipo natural (figura 11). Tal como se representa en la Tabla 3, el orden de la afinidad de unión con el C1q fue el siguiente: E333S>E333A>E333G>E333V>E333D>E333Q. Las sustituciones con aminoácidos con unos volúmenes pequeños en la cadena lateral, es decir, serina, alanina y glicina, produjo unos mutantes con una mayor afinidad hacia el C1q en comparación con los otros mutantes, E333V, E333D y E333Q, con unos volúmenes superiores en la cadena lateral. El mutante E333S presentó la mayor afinidad hacia el C1q, con un aumento de dos veces en la unión en comparación con el tipo natural. Sin ligarse a ninguna teoría, ello indica que el efecto en la unión con el C1q en 333 se puede deber asimismo en parte a la polaridad del aminoácido.

Se generaron asimismo mutantes dobles. Tal como se representa en las figuras 12 y 13, los mutantes dobles K326ME333S y K326AE333A fueron por lo menos tres veces mejores en unión con el C1q humano que el C2B8 natural (figura 12) y por lo menos dos veces mejores en la intervención en la CDC en comparación con el C2B8 natural (figura 13). La aditividad indica que estos son mutantes que actúan independientemente.

Se generó un mutante doble adicional, K326W-E333S, que era seis veces mejor en la unión con el C1q humana y tres veces mejor en la intervención en la CDC en comparación con el C2B8 natural. Dicho mutante doble carecía de actividad de la ADCC en un ensayo basado en células.

Tal como se representa en la figura 14, se realizó un mutante adicional con un mejora enlace con el C1q (un aumento del 50%) cambiando el A327 en una región constante de la IgG1 humana a glicina. En cambio, en una región constante de la IgG2 humana, el cambio de G327 a alanina reduce la unión con el C1q del anticuerpo IgG2.

Listado de la secuencia

<110> Esohe Ekinaduese Idusogie y otros.

<120> Variantes polipeptídicas

ES 2 532 910 T3

<130> P1266

<140> US 09/054,255

<141> 1998-04-02

<160> 2

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> La secuencia está completamente sintetizada

<400> 1

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

ES 2 532 910 T3

	Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu	155	160	165
5	Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	170	175	180
10	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	185	190	195
	Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr	200	205	210
15	Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	215		
20	<210> 2			
	<211> 451			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia Artificial			
25	<220>			
	<223> La secuencia está completamente sintetizada			
	<400> 2			
30	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly	1	5	10
35	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr	20	25	30
40	Ser Gly Tyr Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	35	40	45
	Leu Glu Trp Val Ala Ser Ile Lys Tyr Ser Gly Glu Thr Lys Tyr	50	55	60
45	Asn Pro Ser Val Lys Gly Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser	65	70	75
50	Lys Asn Thr Phe Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp	80	85	90
	Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ser His Tyr Phe Gly His	95	100	105
55	Trp His Phe Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser	110	115	120
60	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser	125	130	135
	Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val			

ES 2 532 910 T3

					140					145					150
5	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly
					155					160					165
	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
10					170					175					180
	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
					185					190					195
15	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
					200					205					210
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
20					215					220					225
	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
					230					235					240
25	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
					245					250					255
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
30					260					265					270
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
					275					280					285
35	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
					290					295					300
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
40					305					310					315
	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
					320					325					330
45	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
					335					340					345
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu
50					350					355					360
	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
					365					370					375
55	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
					380					385					390
	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
60					395					400					405

ES 2 532 910 T3

	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
					410					415					420
5	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
					425					430					435
10	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
					440					445					450
	Lys														

REIVINDICACIONES

1. Variante de un polipéptido original que comprende una región Fc de una IgG1 o IgG3 humana, cuya variante presenta una afinidad de unión mejor con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende una sustitución de aminoácidos en la región Fc de la IgG en la posición del aminoácido 326, 333 o 334, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).
2. Variante según la reivindicación 1, en la que la afinidad de unión de la variante con respecto al C1q humano es aproximadamente el doble o más que la afinidad de unión del polipéptido original con respecto al C1q humano.
3. Variante según la reivindicación 1, en la que la afinidad de unión de la variante con respecto al C1q humano es aproximadamente cinco veces o más que la afinidad de unión del polipéptido original con respecto al C1q humano.
4. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido original interviene la destrucción celular dependiente del complemento.
5. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polipéptido original comprende una región Fc de la IgG1.
6. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el aminoácido de la posición del aminoácido 326 se sustituye por triptófano.
7. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la variante presenta una mayor afinidad de unión con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones del aminoácido 327 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.
8. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la variante presenta una mayor afinidad de unión con respecto al C1q humano que el polipéptido original y comprende sustituciones de aminoácidos en dos o más posiciones de aminoácidos 326, 327, 333 y 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.
9. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el polipéptido original comprende un anticuerpo.
10. Composición que comprende la variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
11. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la variante comprende una sustitución de aminoácido en las posiciones de los aminoácidos 326, 327, 333 o 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.
12. Variante según la reivindicación 11, que comprende sustituciones de aminoácidos en tres o más posiciones de los aminoácidos 326, 327, 333 o 334.
13. Variante según la reivindicación 12, que comprende sustituciones de aminoácidos en las posiciones de los aminoácidos 326, 327, 333 y 334.
14. Procedimiento para modificar un polipéptido que comprende una región Fc de una IgG humana que comprende la sustitución de un aminoácido en las posiciones de los aminoácidos 326, 327, 333 o 334 de la región Fc de la IgG humana, siendo la numeración de los aminoácidos de la región Fc de la IgG la del índice EU tal como se indica en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* ["Secuencias de proteínas de interés en Inmunología"], 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), en la que la región Fc de la IgG humana es una región Fc de la IgG1 o la IgG3 humana.

- 5
15. Ácido nucleico aislado que codifica la variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11 a 13.
16. Vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 15.
17. Célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 16.
- 10
18. Procedimiento para producir una variante polipeptídica que comprende cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 17, de tal modo que se expresa el ácido nucleico.
19. Procedimiento según la reivindicación 18, que comprende además la recuperación de la variante a partir del cultivo de la célula hospedadora.
- 15
20. Variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 11 a 13 para utilizar como medicamento.

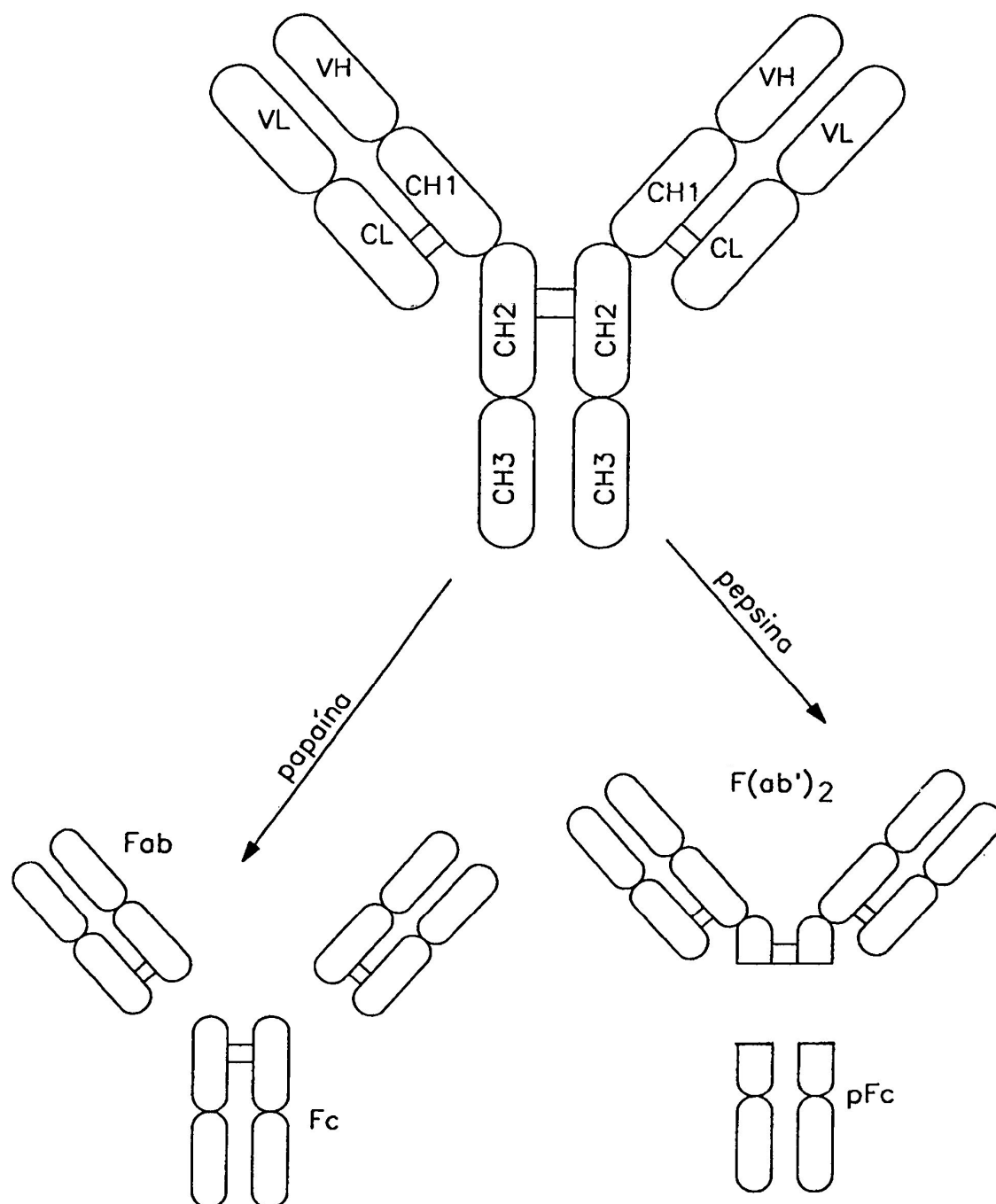


FIG. 1

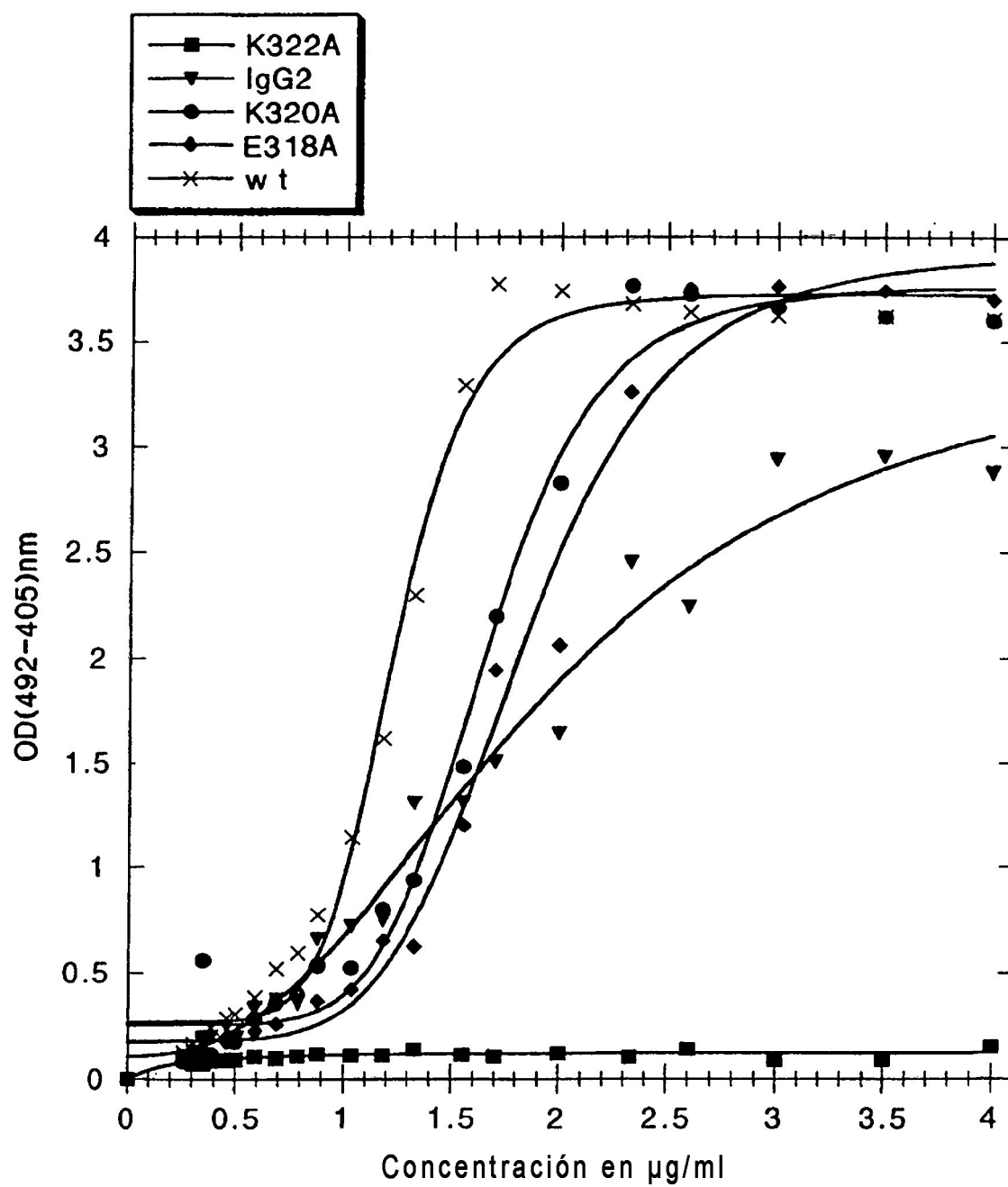


FIG. 2

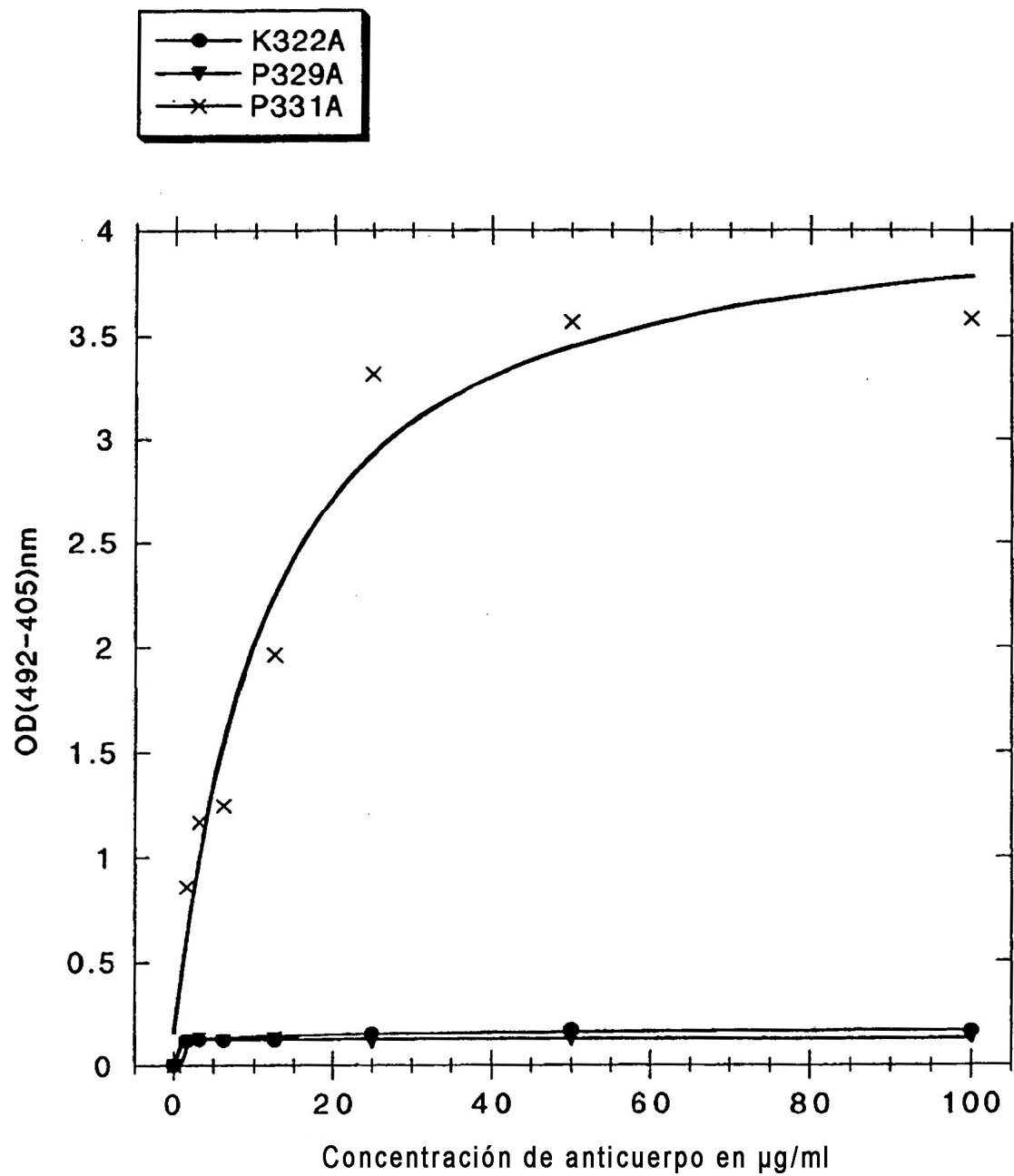


FIG. 3

FIG. 4A (E27) - Cadena Ligera

DIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASKPVD GEGDSYMNWY QQKPGKAPKL LIYAASYLES GVPSPFSGSG
SGTDFTLTIS SLQPEDFATY YCQQSHEDPY TFGQGTKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL
NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT
KSFNRGEC

FIG. 4B (E27) - Cadena Pesada

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAVSGYSIT SGYSWNWIRQ APGKGLEWVA SIKYSGETKY NPSVKGRITI
SRDDSKNTFY LQMNSLRAED TAVYVCARGS HYFGHWHFAV WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS
GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TTPSSSLGTQ TYICNVNHKP
SNTKVDKKVE PKSCDKTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN
WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
QVYTLPPSRE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR
WQQGNVFCSS VMHEALHNY TQKSLSLSPG K

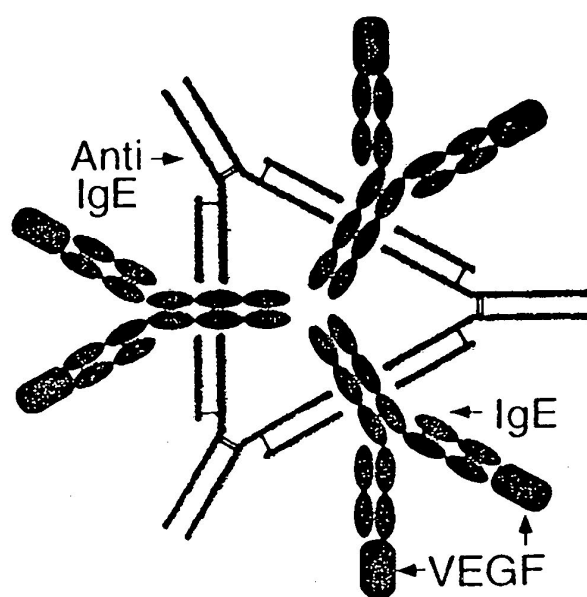
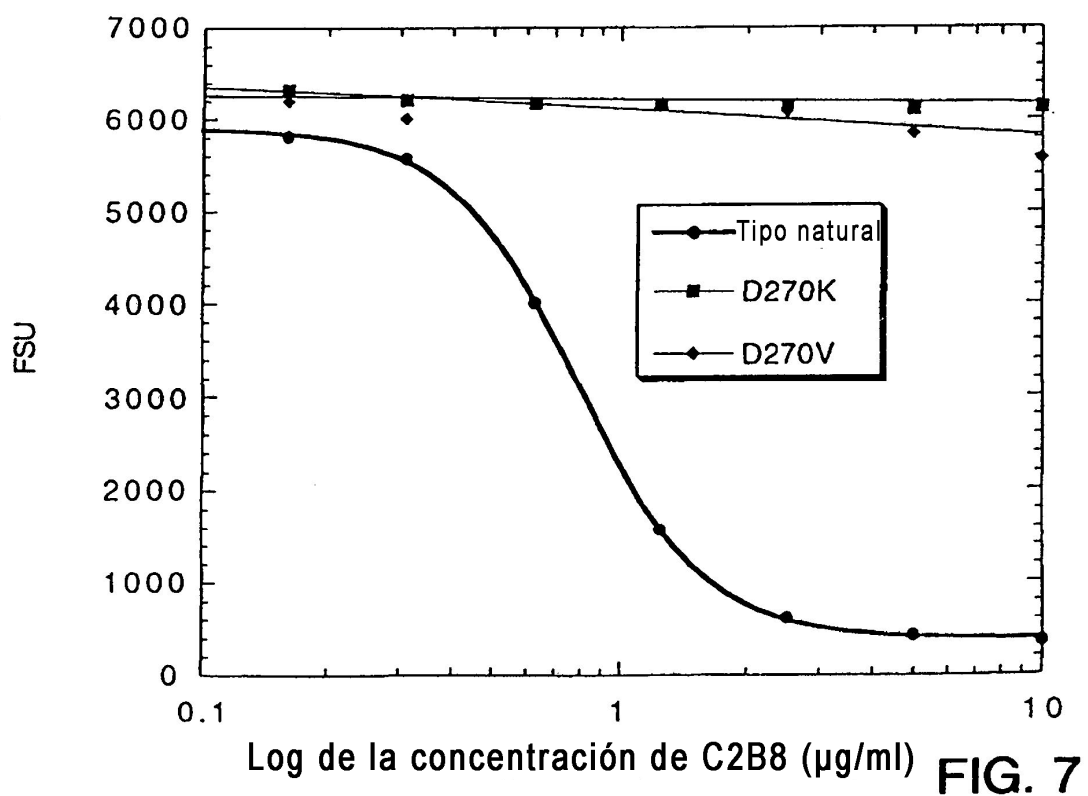
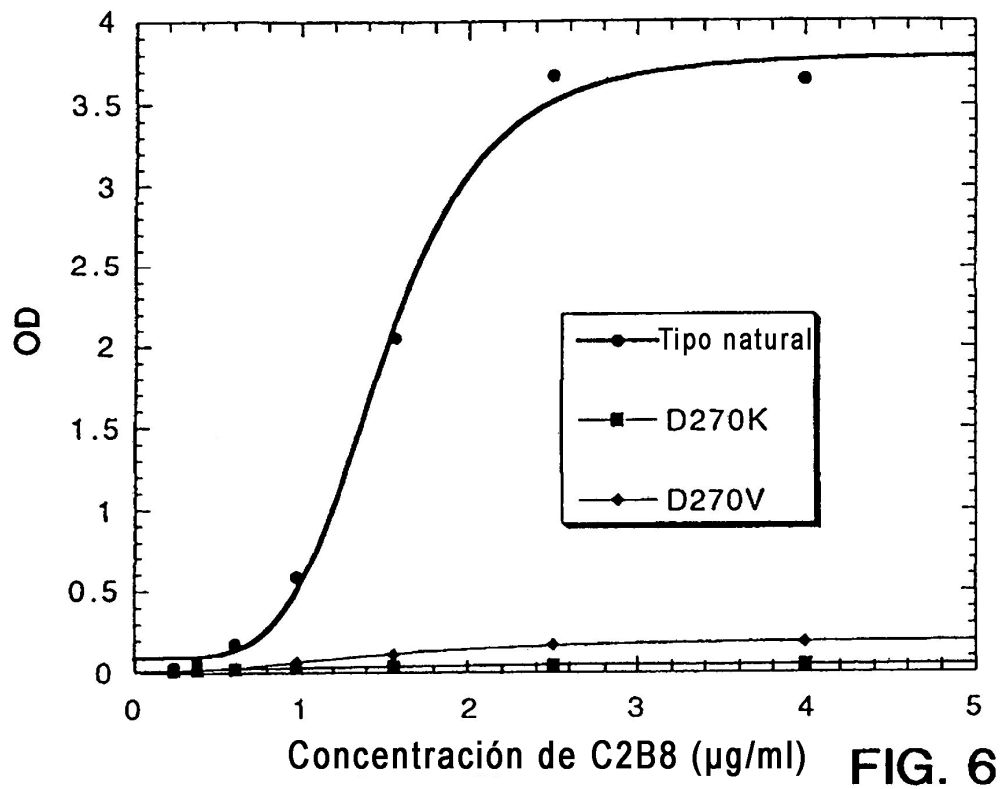


FIG. 5



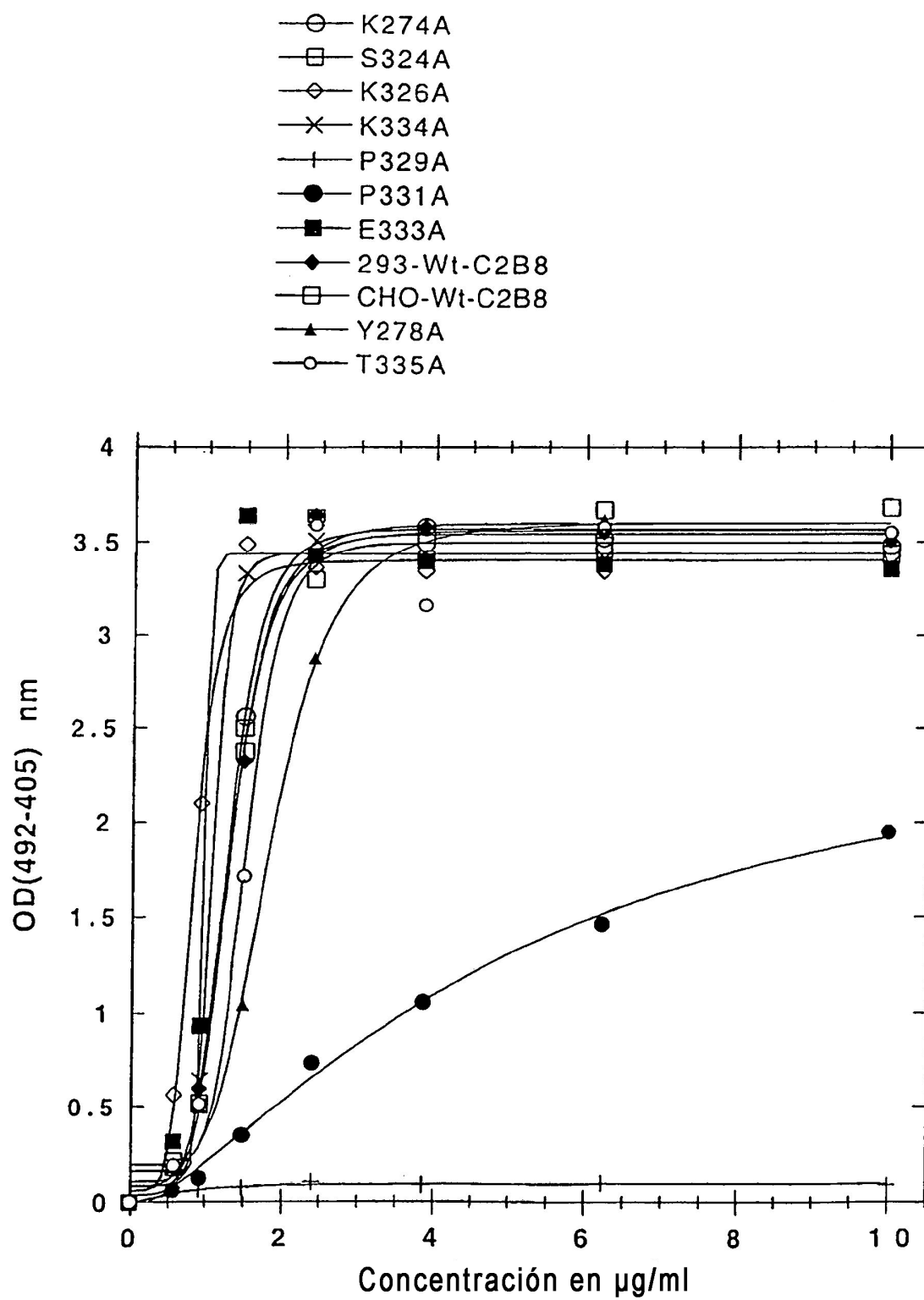


FIG. 8

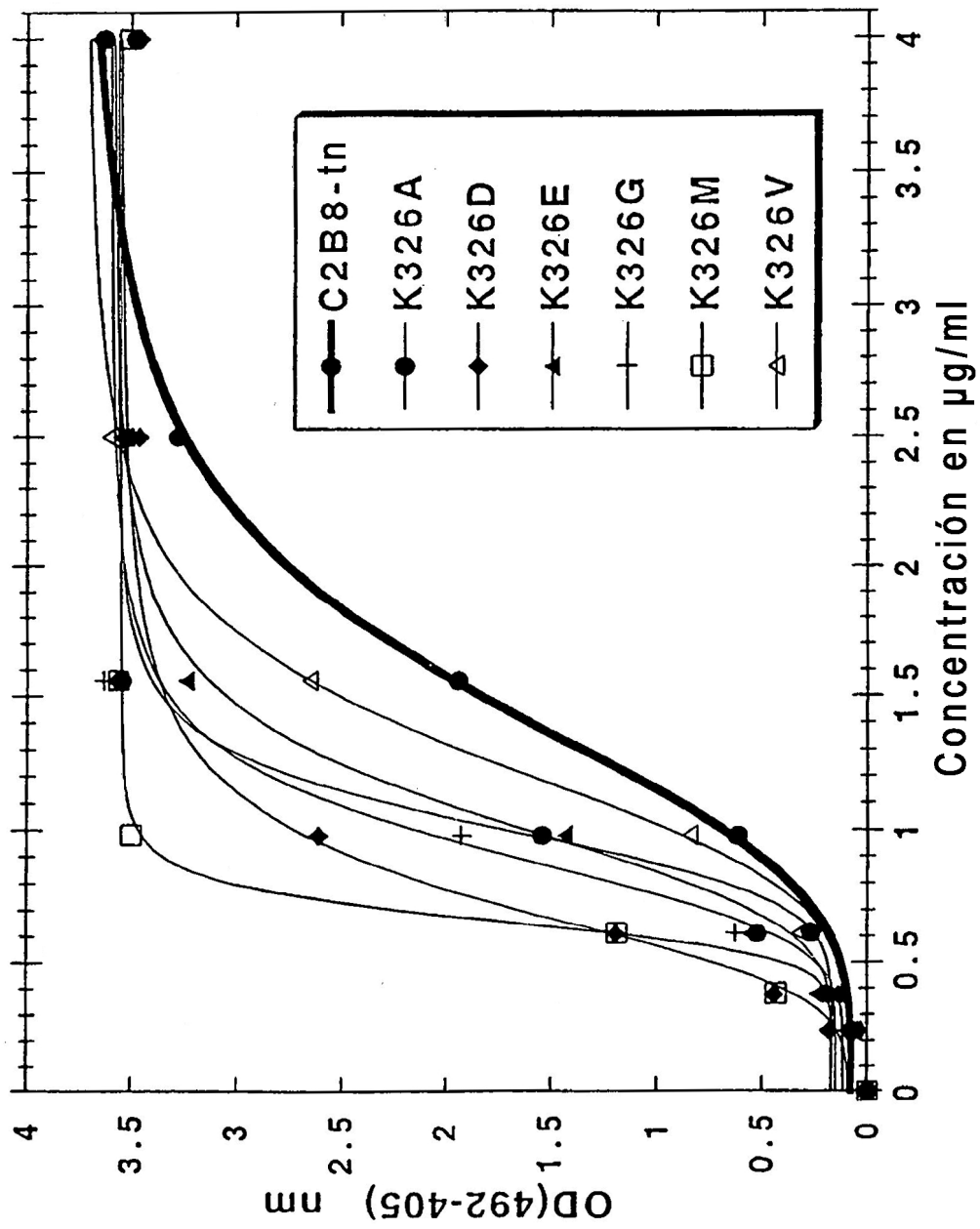


FIG. 9

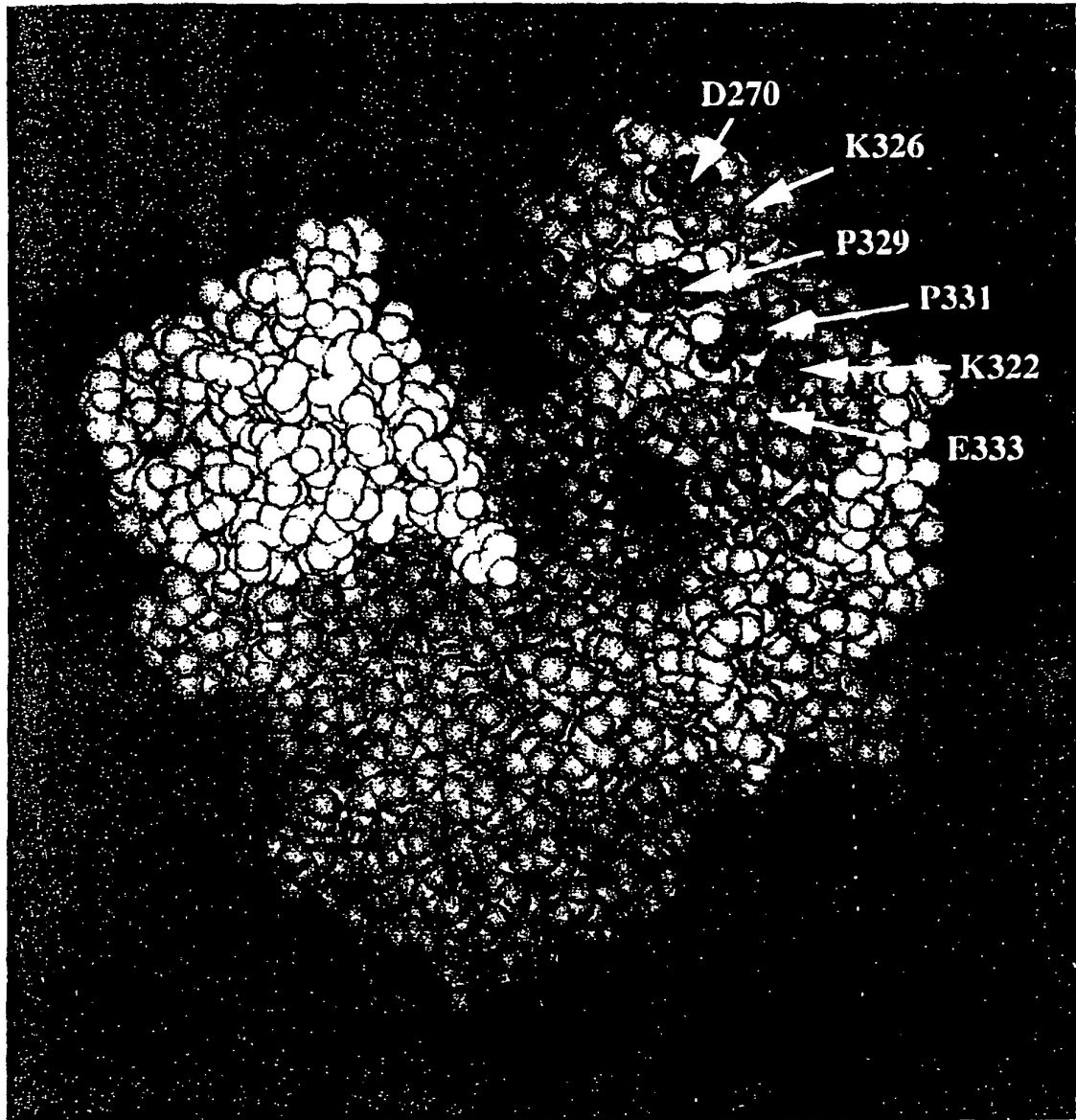


FIG. 10

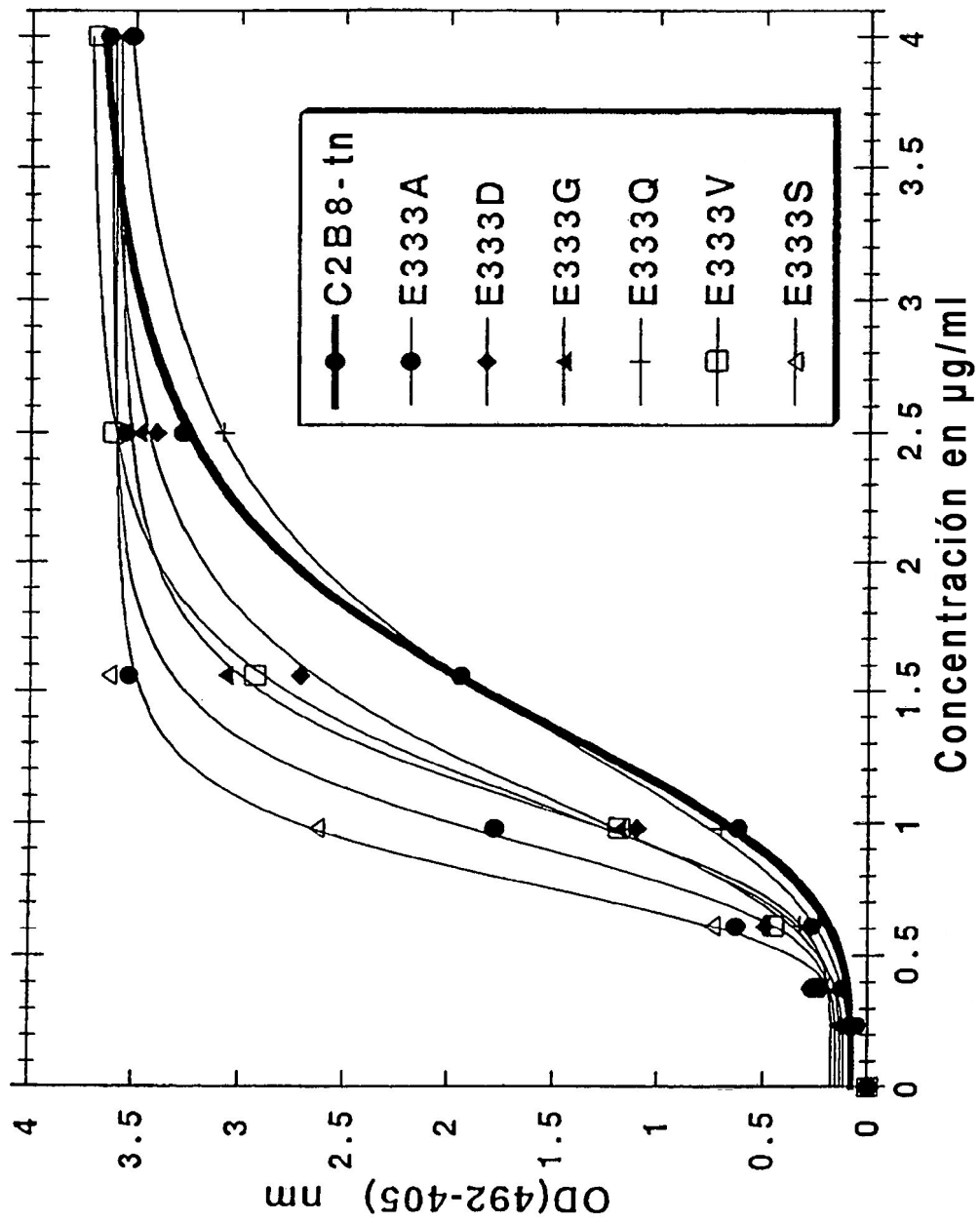
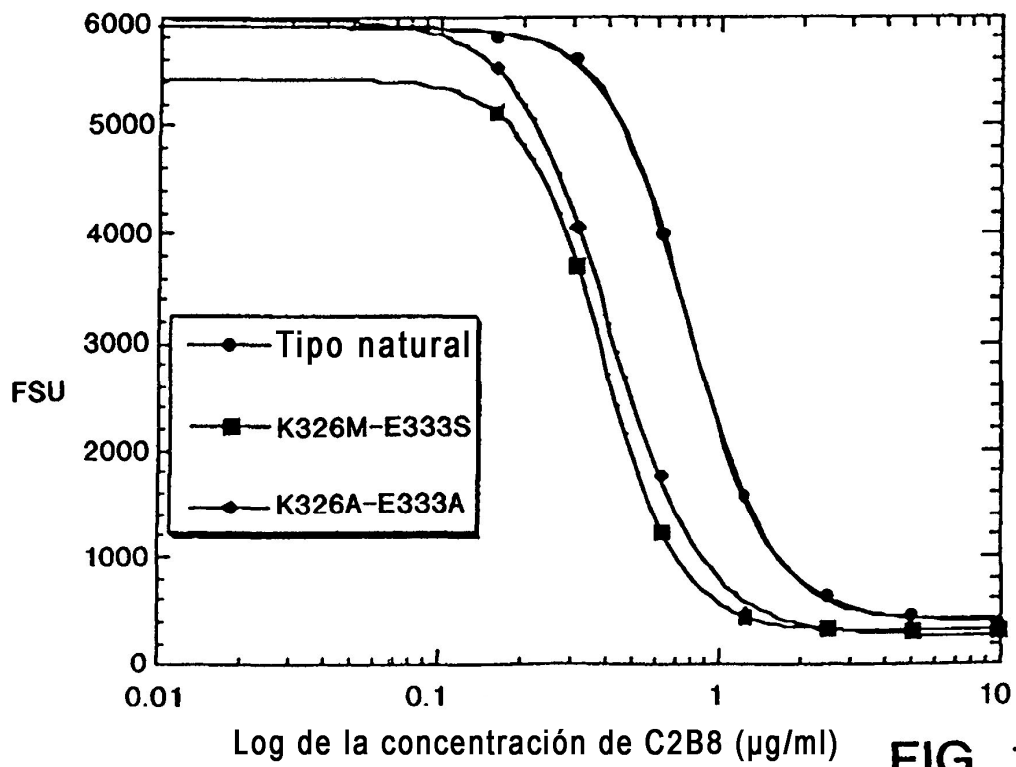
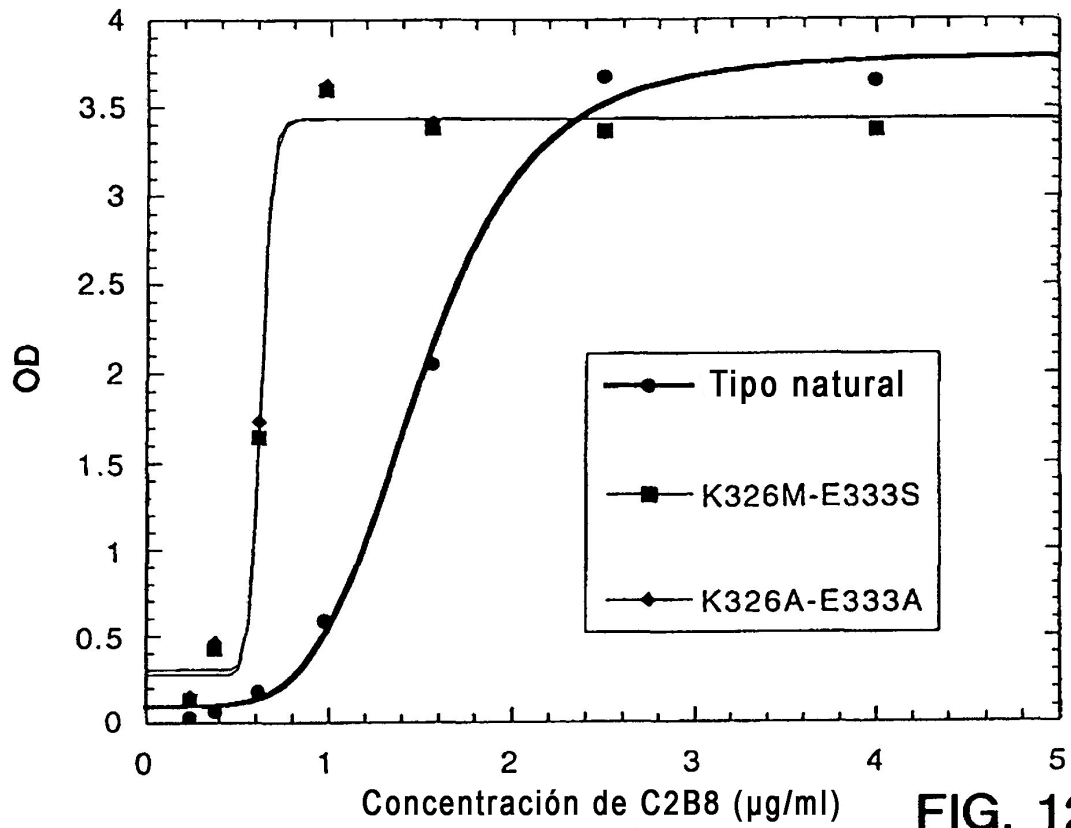


FIG. 11



EC50 de tn-C2B8 = 1.54
EC50 de A327g (C2B8) = 1.08

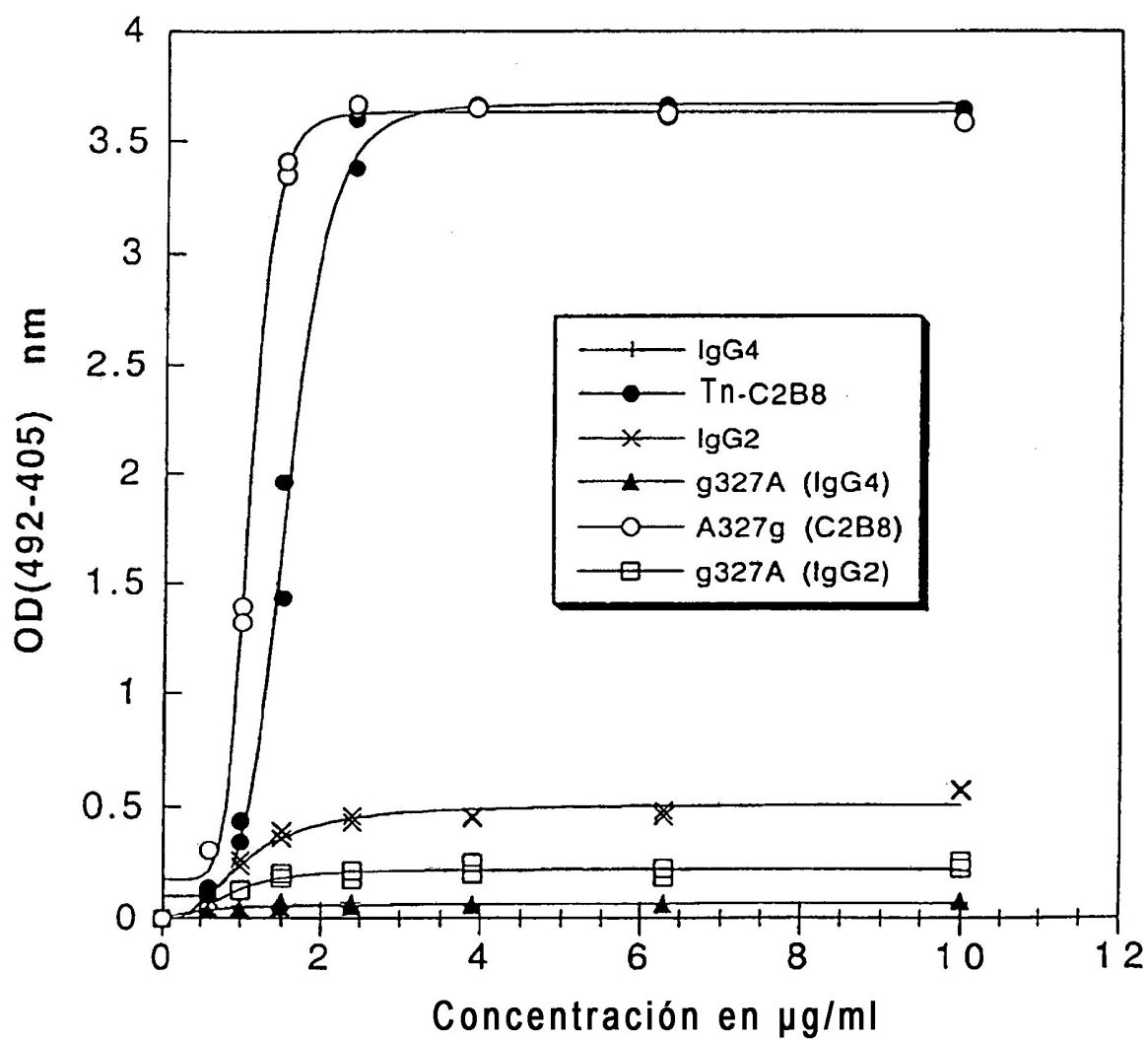


FIG. 14