

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 282**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/32** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/08** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008 E 12150987 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2444423**

54 Título: **Variantes de Fc con unión alterada a FcRn**

30 Prioridad:

**31.10.2007 US 932151**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 537 282 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de Fc con unión alterada a FcRn

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

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayor parte de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas. Cada cadena está compuesta por dominios de inmunoglobulinas (Ig) individuales, y así el término genético inmunoglobulina se usa para dichas proteínas. Cada cadena está compuesta por dos regiones distintas, referidas como las regiones variable y constante. Las regiones variables de la cadena ligera y pesada muestran una diversidad de secuencia significativa entre anticuerpos, y son responsables de la unión al antígeno diana. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia, y son responsables de la unión a varias proteínas naturales para incitar eventos bioquímicos importantes. En los seres humanos hay cinco clases diferentes de anticuerpos incluyendo IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), e IgM. La característica diferencial entre estas clases de anticuerpos es sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias sutiles en la región V. La Figura 1 muestra un anticuerpo IgG1, usado aquí como un ejemplo para describir las características estructurales generales de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos IgG son proteínas tetraméricas compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada de IgG está compuesta por cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al C en el orden VH-CH1-CH2-CH3, en referencia al dominio variable de la cadena pesada, dominio constante 1 de cadena pesada, dominio constante 2 de cadena pesada, y dominio constante 3 de cadena pesada respectivamente (también referido como VH-C $\gamma$ 1-C $\gamma$ 2-C $\gamma$ 3, en referencia al dominio variable de cadena pesada, dominio constante gamma 1, dominio constante gamma 2, y dominio constante gamma 3 respectivamente). La cadena ligera de IgG está compuesta por dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N al C en el orden VL-CL, en referencia al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera respectivamente.

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula, y así determina la especificidad de un anticuerpo para su antígeno diana. La región variable se denomina así porque es la más distinta en secuencia de los demás anticuerpos en la misma clase. La mayor parte de la variabilidad de secuencia ocurre en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Hay 6 CDR en total, tres por cada cadena pesada y ligera, designadas VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3. La región variable fuera de las CDR se refiere como la región marco (FR). Aunque no es tan diversa como las CDR, aparece variabilidad de secuencia en la región FR entre diferentes anticuerpos. Globalmente, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un soporte estable (la región FR) sobre el que el sistema inmune puede explorar una diversidad de unión a antígeno sustancial (las CDR) para obtener especificidad para una matriz amplia de antígenos. Están disponibles varias estructuras de alta resolución para una variedad de fragmentos de región variable de diferentes organismos, algunas no unidas y algunas formando un complejo con el antígeno. La secuencia y características estructurales de las regiones variables de anticuerpo están bien caracterizadas (Morea et al., 1997, *Biophys Chem* 68:9-16; Morea et al., 2000, *Methods* 20:267-279), y las características conservadas de los anticuerpos han permitido el desarrollo de una gran cantidad de técnicas de ingeniería de anticuerpos (Maynard et al., 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-376). Por ejemplo, es posible injertar las CDR de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo murino, en la región marco de otro anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo humano. Este proceso, referido en la técnica como "humanización", permite la generación de agentes terapéuticos de anticuerpo menos inmunogénicos a partir de anticuerpo no humanos. Los fragmentos que incluyen la región variable pueden existir en ausencia de otras regiones del anticuerpo, incluyendo por ejemplo el fragmento de unión a antígeno (Fab) que incluye VH-C $\gamma$ 1 y VH-CL, el fragmento variable (Fv) que incluye VH y VL, el fragmento variable de cadena única (scFv) que incluye VH y VL unidos entre sí en la misma cadena, así como una variedad de otros fragmentos de región variable (Little et al., 2000, *Immunol Today* 21:364-370).

La región Fc de un anticuerpo interacciona con varios receptores y ligandos de Fc, confiriendo un conjunto de capacidades funcionales importantes referidas como funciones efectoras. Para IgG la región Fc, como se muestra en las Figuras 1 y 2, comprende dominios Ig C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 y la bisagra N-terminal hacia C $\gamma$ 2. Una familia importante de receptores de Fc para la clase IgG es los receptores de Fc gamma (FcyR). Estos receptores median la comunicación entre anticuerpos y el brazo celular del sistema inmune (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290). En los seres humanos, esta familia de proteínas incluye FcyRI (CD64), que incluye las isoformas FcyRIa, FcyRIb, y FcyRIc; FcyRII (CD32), incluyendo las isoformas FcyRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcyRIIb (incluyendo FcyRIIb-1 y FcyRIIb-2), y FcyRIIc; y FcyRIII (CD16), que incluye las isoformas FcyRIIIa (que incluye los alotipos V158 y F158) y FcyRIIIb (que incluye los alotipos FcyRIIIb-NA1 y FcyRIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Estos receptores tienen típicamente un dominio extracelular que media la unión a Fc, una región que se extiende en la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar algún evento de señalización en el interior de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunes que incluyen monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos,

plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK), y células T  $\gamma\gamma$ . La formación del complejo Fc/Fc $\gamma$ R recluta estas células efectoras a sitios de antígeno unido, lo que resulta típicamente en eventos de señalización en el interior de las células y respuestas inmunes importantes tales como la liberación de mediadores de la inflamación, activación de células B, endocitosis, fagocitosis, y ataque citotóxico. La capacidad para mediar funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un mecanismo potencial por el que los anticuerpos destruyen las células diana. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan Fc $\gamma$ R reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana se refiere como citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766; Ravetch et al., 2001, *Annu Rev Immunol* 19:275-290,). La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan Fc $\gamma$ R reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana se refiere como fagocitosis mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCP). Se han resuelto varias estructuras de los dominios extracelulares de Fc $\gamma$ R humanos, que incluyen Fc $\gamma$ RIIIa (código de acceso pdb 1H9V),(Sondermann et al., 2001, *J Mol Biol* 309:737-749,.) (código de acceso pdb 1FCG)(Maxwell et al., 1999, *Nat Struct Biol* 6:437-442), Fc $\gamma$ RIIb (código de acceso pdb 2FCB)(Sondermann et al., 1999, *Embo J* 18:1095-1103); y Fc $\gamma$ RIIIb (código de acceso pdb 1E4J)(Sondermann et al., 2000, *Nature* 406:267-273). Todos los Fc $\gamma$ R se unen a alguna región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio C $\gamma$ 2 y la bisagra precedente, mostrado en la Figura 1. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann et al., 2001, *J Mol Biol* 309:737-749), y se han resuelto varias estructuras del Fc humano unido al dominio extracelular del Fc $\gamma$ RIIIb humano (código de acceso pdb 1E4K)(Sondermann et al., 2000, *Nature* 406:267-273) (códigos de acceso pdb 1IIS y 1IIX)(Radaev et al., 2001, *J Biol Chem* 276:16469-16477), así como se ha resuelto la estructura del complejo IgE Fc/Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  humano (código de acceso pdb 1F6A)(Garman et al., 2000, *Nature* 406:259-266). La respuesta de función efectora puede modificarse por variantes de la región Fc (Lazar et al. 2006 *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. 103(111):4005-4010).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades para los Fc $\gamma$ R, con IgG1 e IgG3 uniéndose típicamente sustancialmente mejor a los receptores que IgG2 e IgG4 (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65). Todos los Fc $\gamma$ R se unen a la misma región en Fc de IgG, pero con diferentes afinidades: el ligante con mayor afinidad Fc $\gamma$ RI tiene una K $d$  para IgG1 de  $10^8$  M $^{-1}$ , mientras los receptores con baja afinidad Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII generalmente se unen a  $10^6$  y  $10^5$  respectivamente. Los dominios extracelulares de Fc $\gamma$ RIIIa y Fc $\gamma$ RIIIb son 96% idénticos; sin embargo, Fc $\gamma$ RIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa/c, y Fc $\gamma$ RIIIa son reguladores positivos de la activación desencadenada por el complejo inmune, caracterizados por tener un dominio intracelular que tiene un resto de activación basado en tirosina de inmunoreceptor (ITAM), Fc $\gamma$ RIIb tiene un resto de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptor (ITIM) y, por lo tanto, es inhibidor. Así, los primeros se refieren como receptores de activación, y Fc $\gamma$ RIIIb se refiere como un receptor inhibidor. Los receptores también se diferencian en el patrón de expresión y en los niveles en diferentes células inmunes. Otro nivel más de complejidad es la existencia de varios polimorfismos de Fc $\gamma$ R en el proteoma humano. Un polimorfismo particularmente relevante con significancia clínica es V158/F158 Fc $\gamma$ RIIIa. IgG1 humana se une con mayor afinidad al alotipo V158 que al alotipo F158. Se ha mostrado que esta diferencia en afinidad, y presumiblemente su efecto en ADCC y/o ADCP, es un determinante significativo de la eficacia del anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®, BiogenIdec). Los pacientes con el alotipo V158 responden favorablemente a tratamiento con rituximab; sin embargo, los pacientes con el alotipo F158 de menor afinidad responden poco (Cartron et al., 2002, *Blood* 99:754-758). Aproximadamente 10-20% de los seres humanos son homocigotos V158/V158, 45% son heterocigotos V158/F158, y 35-45% de los seres humanos son homocigotos F158/F158 (Lehrnbecher et al., 1999, *Blood* 94:4220-4232; Cartron et al., 2002, *Blood* 99:754-758). Así, el 80-90% de los seres humanos responden poco, es decir, tienen al menos un alelo del F158 Fc $\gamma$ RIIIa.

Un sitio superpuesto, pero separado, en Fc, mostrado en la Figura 1, sirve como la interfase para la proteína de complemento C1q. De la misma manera en la que la unión de Fc/Fc $\gamma$ R media ADCC, la unión de Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). C1q forma un complejo con las serina proteasas C1r y C1s para formar el complejo C1. C1 q es capaz de unirse a seis anticuerpos, aunque la unión a dos IgG es suficiente para activar la cascada del complemento. De manera similar a la interacción de Fc con Fc $\gamma$ R, diferentes subclases de IgG tienen diferente afinidad para C1q, con IgG1 e IgG3 uniéndose típicamente sustancialmente mejor a los Fc $\gamma$ R que IgG2 e IgG4 (Jefferis et al., 2002, *Immunol Lett* 82:57-65).

En IgG, un sitio en Fc entre los dominios C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 (Figura 1) media la interacción con el receptor neonatal FcRn, cuya unión recicla el anticuerpo sometido a endocitosis del endosoma de nuevo a la corriente sanguínea (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:181-220; Ghetie et al., 2000, *Annu Rev Immunol* 18:739-766). Este proceso, acoplado con el impedimento de la filtración renal debida al gran tamaño de la molécula de longitud completa, resulta en vidas medias séricas del anticuerpo favorables que varían de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también juega un papel clave en el transporte del anticuerpo. El sitio de unión en Fc para FcRn también es el sitio en el que se unen las proteínas bacterianas A y G. La unión firme por estas proteínas se explota típicamente como un medio para purificar anticuerpos empleando cromatografía de afinidad de proteína A o proteína G durante la purificación de las proteínas. Así, la fidelidad de esta región en Fc es importante tanto para las propiedades clínicas del anticuerpo como su purificación. Las estructuras disponibles del complejo Fc/FcRn de rata (Burmeister et al., 1994, *Nature*, 372:379-383; Martin et al., 2001, *Mol Cell* 7:867-877), y de los complejos de Fc con las proteínas A y G (Deisenhofer, 1981, *Biochemistry* 20:2361-2370; Sauer-Eriksson et al., 1995, *Structure* 3:265-278; Tashiro et al., 1995, *Curr Opin Struct Biol* 5:471-481), proporcionan conocimiento sobre la interacción de Fc con estas proteínas. El

receptor FcRn también es responsable de la transferencia de IgG al intestino neonatal y al lumen del epitelio intestinal en los adultos (Ghetie y Ward, Annu. Rev. Immunol., 2000, 18:739-766; Yoshida et al., Immunity, 2004, 20(6):769-783).

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

15 En la Fc murina, la mutación aleatoria y la selección por exposición en fago en los sitios, T252, T254, y T256 dio lugar a un triple mutante, T252L/T254S/T256F, que tiene un incremento de 3,5 veces en la afinidad por FcRn y un incremento de 1,5 veces en la vida media sérica (Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15(7): 637-640). La disrupción de la interacción Fc/FcRn por mutaciones en las posiciones 253, 310 y 435 también dio lugar a una vida media *in vivo* disminuida (Medesan et al J. Immunol. 1997 158(5):2211-7).

20 Las estructuras cristalinas del complejo Fc/FcRn de rata identificaron residuos en Fc importantes para la unión a FcRn (Burmeister et al. Nature. 372:379-383 (1994); Martin et al. Molecular Cell. 7:867-877 (2001)). La estructura original del complejo Fc/FcRn se resolvió en 1994 hasta una resolución de 6 Å (Tabla 2a, Burmeister et al. Nature. 372:379-383 (1994)). La estructura de mayor resolución, resuelta en 2001 por Marin et al, mostró una visión más detallada de las posiciones de las cadenas laterales (Martin et al. Molecular Cell. 7:867-877 (2001)). Esta estructura cristalina de Fc de rata unido a FcRn de rata se resolvió usando un dímero de Fc con un monómero que contenía las mutaciones T252G/I253G/T254G/H310E/H433E/H435E, que disrumpen la unión a FcRn, y un monómero que contenía un monómero Fc de tipo salvaje.

Los estudios mutacionales en Fc $\gamma$  humano se han realizado en algunos de los residuos que son importantes para la unión a FcRn y han demostrado una vida media sérica incrementada. En Fc $\gamma$ 1 humano, Hinton et al. mutaron tres residuos individualmente a los otros 19 aminoácidos comunes. Hinton et al., encontraron que algunos mutantes puntuales un doble mutante incrementaron la afinidad de unión de FcRn (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216. Hinton et al. Journal of Immunology 2006, 176:346-356). Dos mutaciones tuvieron vidas medias incrementadas en monos. Shields et al. mutaron residuos, casi exclusivamente a Ala, y estudiaron su unión a FcRn y los Fc $\gamma$ R (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604).

35 Dall'Acqua et al. usaron exposición en fagos para seleccionar mutaciones de Fc que se unían a FcRn con afinidad incrementada (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180). Las secuencias de ADN seleccionadas fueron principalmente mutantes dobles y triples. La referencia expresó las proteínas codificadas por muchas de sus secuencias seleccionadas y encontraron algunas que se unían a FcRn más fuertemente que Fc de tipo salvaje.

40 La administración de anticuerpos y proteínas de fusión Fc como terapéuticos requiere inyecciones con una frecuencia prescrita respecto a las características de aclaramiento y vida media de la proteína. Las vidas media más largas *in vivo* permiten inyecciones menos frecuentes o dosificación menor, lo que es claramente ventajoso. Aunque las mutaciones anteriores en el dominio Fc han dado lugar a algunas proteínas con afinidad de unión incrementada a FcRn y vidas medias incrementadas *in vivo*, estas mutaciones no han identificado las mutaciones óptimas y vida media aumentada *in vivo*.

45 Una característica de la región Fc es la glicosilación ligada a N conservada que ocurre en N297, mostrada en la Figura 1. Este carbohidrato, u oligosacárido como se refiere algunas veces, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales por las que deben producirse los anticuerpos usando sistemas de expresión de mamíferos. Umaña et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Mimura et al., 2001, J Biol Chem 276:45539-45547.; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16478-16483; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Simmons et al., 2002, J Immunol Methods 263:133-147; Radaev et al., 2001, J Biol Chem 276:16469-16477; y Krapp et al., 2003, J Mol Biol 325:979-989,).

55 Se han desarrollado anticuerpos para uso terapéutico. Las publicaciones representativas relacionadas con dichas terapias incluyen Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200, Cragg et al., 1999, Curr Opin Immunol 11:541-547; Glennie et al., 2000, Immunol Today 21:403-410, McLaughlin et al., 1998, J Clin Oncol 16:2825-2833, y Cobleigh et al., 1999, J Clin Oncol 17:2639-2648. Actualmente, para la terapia anticancerosa, cualquier pequeña mejora en la proporción de mortalidad define el éxito. Determinadas variantes de IgG descritas en la presente memoria aumentan la capacidad de los anticuerpos para limitar el crecimiento adicional o destruir al menos parcialmente, células cancerosas diana.

La potencia anti-tumoral de los anticuerpos es mediante el aumento de su capacidad de mediar funciones efectoras citotóxicas tales como ADCC, ADCCP, y CDC. Los ejemplos incluyen Clynes et al., 1998, Proc Natl Acad Sci U S A 95:652-656; Clynes et al., 2000, Nat Med 6:443-446 y Cartron et al., 2002, Blood 99:754-758.

5 La IgG1 humana es el anticuerpo usado más comúnmente para propósitos terapéuticos, y la mayoría de los estudios de ingeniería se han construido en este contexto. Los diferentes isotipos de la clase IgG sin embargo, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, tienen propiedades físicas, biológicas, y clínicas únicas. Existe una necesidad en la técnica de diseñar variantes mejoradas de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Existe una necesidad adicional de diseñar dichas variantes para mejorar la unión a FcRn y/o incrementar la vida media *in vivo* comparada con los polipéptidos IgG nativos. Además, existe una necesidad de combinar variantes con propiedades farmacocinéticas mejoradas con  
10 variantes que comprenden modificaciones para mejorar la eficacia mediante unión alterada a FcγR. La presente solicitud cumple con éstas y otras necesidades.

### RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente solicitud está dirigida a variantes de Fc de un polipéptido parental incluyendo al menos una modificación en la región Fc del polipéptido. Los polipéptidos variantes presentan una unión incrementada a FcRn comparada con un polipéptido parental.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para incrementar la vida media de un anticuerpo IgG humano que comprende modificar una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que dicha región Fc se modifica para sustituir una asparagina con una serina en la posición 434, en el que dicho anticuerpo IgG humano modificado es un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4 y en el que la numeración es según el índice EU en Kabat et al.

20 En otra variación, dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende una región Fc.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Estructura y función del anticuerpo. Se muestra un modelo de un anticuerpo IgG1 humano de longitud completa, modelado usando una estructura Fab humanizada de código de registro pdb 1 CE1 (James et al., 1999, J Mol Biol 289:293-301) y una estructura de Fc de IgG1 humana de código de registro pdb 1 DN2 (DeLano et al.,  
25 2000, Science 287:1279-1283). La bisagra flexible que une las regiones Fab y Fc no se muestra. IgG1 es un homodímero de heterodímeros, constituido por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Los dominios Ig que comprende el anticuerpo están marcados, e incluyen V<sub>L</sub> y C<sub>L</sub> para la cadena ligera, y V<sub>H</sub>, Cγ1, Cγ2, y Cγ3 para la cadena pesada. La región Fc está marcada. Los sitios de unión para proteínas relevantes están marcados, incluyendo el sitio de unión a antígeno en la región variable, y los sitios de  
30 unión para FcγR, FcRn, C1q, y proteínas A y G en la región Fc.

Figura 2. Secuencias de IgG humana (SEQ ID NOS: 1-4) usadas en la presente invención con la numeración EU como en Kabat et al.

Figura 3. Ejemplo de secuencias de IgG humanas y de roedor (SEQ ID NOS: 5-6) usadas en la presente invención con la numeración EU como en Kabat.

35 Figura 4. Ejemplo de secuencias de cadena pesada FcRn humanas y de roedor (SEQ ID NOS: 7-8) usadas en la presente invención.

Figura 5. Ejemplo de secuencias de beta-2-microglobulina humana y de roedor (SEQ ID NOS: 9-10) usadas en la presente invención.

40 Figura 6. Un modelo de complejo Fc/FcRn humano creado a partir de las estructuras de rata (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877). Algunos residuos de histidina se muestran en átomos de relleno de espacio en las cadenas FcRn (gris claro) y polipéptido Fc (gris oscuro).

Figura 7. Ilustración de algunos conceptos usados en el diseño de variantes que comprenden inserciones o deleciones.

Figura 8a-8b. Variantes de la presente invención.

45 Figura 9a-9b. Variantes de la presente invención.

Figura 10a-10b. Variantes de la presente invención.

Figura 11. Diagrama del vector pcDNA3.1 Zeo+, que puede usarse en la construcción de variantes de Fc.

50 Figura 12a-12b. Datos de unión de competición a FcRn de Fc de tipo salvaje y variantes de Fc de la presente invención. En cada panel, las variantes de Fc de la presente invención se muestran como la curva a la izquierda (rojo o gris oscuro) y el anticuerpo anti-HER2 de tipo salvaje se muestra como la curva a la derecha (azul o gris claro).

- Figuras 13a - 13j. Resumen de las propiedades de unión a FcRn de las variantes de Fc. Las columnas de izquierda a derecha muestran las modificaciones en la unión a FcRn, la inmunoglobulina usada, otras modificaciones, la afinidad relativa de FcRn por ensayos de competición AlphaScreen™ comparado con el tipo salvaje (valor medio), y el número de ensayos realizado. Los números de afinidad relativa de FcRn mayores de 1,0 demuestran una unión incrementada sobre el tipo salvaje. Los datos se recogieron a pH 6,0 (0,1 M fosfato de sodio, 25mM cloruro de sodio).
- Figura 14a-14d. Datos de unión a FcRn de variantes de Fc. Las variantes de Fc están en alemtuzumab o anticuerpo anti-HER2. Se muestran las veces de incremento en la unión comparado con el tipo salvaje, esto es, los números mayores de uno indican unión más fuerte a FcRn mientras los números menores de uno indican unión reducida a FcRn.
- Figura 15. Resumen de los experimentos de resonancia de plasmón superficial de variantes de Fc con unión mejorada a FcRn. El gráfico de barras muestra las veces de incremento en la afinidad de unión a FcRn de cada variante respecto al dominio Fc de tipo salvaje.
- Figura 16a-16b. Experimentos de resonancia de plasmón superficial de anticuerpo de tipo salvaje y variantes de la presente invención. Los trazos mostrados son la asociación y disociación del anticuerpo variante de Fc a FcRn a pH6,0.
- Figura 17a-17c. Ensayos de unión de variantes de Fc de la presente invención a FcRn. Se muestran ensayos de unión directa medidos por AlphaScreen™ a pH 6,0 (a y b) y pH 7,0 (c).
- Figura 18. Ensayos de unión de variantes de Fc de la presente invención a FcRn. Se muestran las unidades de resonancia de plasmón superficial creadas después de la unión de la Fc variante a FcRn unidos a superficie.
- Figura 19. Medida de resonancia de plasmón superficial de la afinidad de unión de variantes de Fc de la presente invención a FcRn humano a pH 6,0.
- Figura 20. Resumen de medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) de la afinidad de unión de variantes de Fc de la presente invención con FcRn humano, de macaco y de ratón. Los números mayores de uno indican unión incrementada del Fc variante a FcRn como se determina ajustando las curvas SPR a un modelo de unión 1:1 de Langmuir.
- Figura 21a-21b. Resumen de las propiedades de unión a FcRn de las variantes de Fc. Las columnas de izquierda a derecha muestran las modificaciones en la unión a FcRn, la inmunoglobulina usada, otras modificaciones, la afinidad relativa de FcRn por ensayos de competición AlphaScreen™ comparado con el tipo salvaje (valor medio), y el número de ensayos realizado. Los números de afinidad relativa de FcRn mayores de 1,0 demuestran una unión incrementada sobre el tipo salvaje. Los datos se recogieron a pH 6,0 (0,1 M fosfato de sodio, 125mM cloruro de sodio).
- Figura 22. Secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 11-12) de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo anti-HER2.
- Figura 23. Secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 13-18) de las regiones constantes (CH1 a CH3) de algunas cadenas pesadas de IgG1 usadas en la presente memoria.
- Figura 24. Secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 19-24) de las regiones constantes (CH1 a CH3) de algunas cadenas pesadas de IgG1/2 híbrido usadas en la presente memoria.
- Figura 25. Unión de variantes de Fc al Fcγ3RIIIA (Alotipo V158) humano como se determina con ensayos de competición AlphaScreen™.
- Figura 26. Unión de variantes de Fc a proteína A como se determina con ensayos de competición AlphaScreen™.
- Figura 27. Concentraciones séricas de WT y variantes de anticuerpos en ratones con activación génica de FcRn humano. Los anticuerpos anti-VEGF usados fueron WT (cuadrados abiertos), V308F (cuadrados cerrados), P257L (triángulos cerrados) y P257N (cruces).
- Figura 28. Ejemplos de variantes de unión FcRn de la presente invención. Los anticuerpos anti-VEGF se listan con el volumen de medio de cultivo y el rendimiento de proteína purificada.
- Figura 29. Afinidad de unión de variantes de la presente invención a FcRn humano a pH6,0. Los valores mostrados son veces de incremento en la fuerza de unión de la variante en cuestión respecto al anticuerpo de tipo salvaje. Por ejemplo, la variante 434S se une a FcRn 4,4 veces más fuertemente de lo que lo hace el anticuerpo de tipo salvaje.
- Figura 30. Unión de anticuerpos WT y variantes a FcRn en la superficie de células 293T.
- Figura 31 a-31 b. Variantes de combinación de la presente invención que comprenden múltiples sustituciones.

Figura 32. Una imagen de las interacciones de un dominio CH3 humano variante que comprende 434S, Ser434 marcado, y FcRn humano.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención describe la generación de nuevas variantes de dominios Fc, incluyendo las encontradas en anticuerpos, fusiones de Fc, e inmuno-adhesiones, que tienen una unión incrementada al receptor FcRn. Como se indica en la presente memoria, la unión a FcRn resulta en una retención en suero más larga *in vivo*.

10 Con el fin de incrementar la retención de las proteínas Fc *in vivo*, el incremento en la afinidad de unión debe ser a alrededor de pH 6 mientras se mantiene una afinidad más baja a alrededor de pH 7,4. Aunque todavía se está examinando, se cree que las regiones Fc tienen vidas medias más largas *in vivo*, porque la unión a FcRn a pH 6 en un endosoma secuestra el Fc (Ghetie y Ward, 1997 Immunol Today. 18(12): 592-598). El compartimento endosomal recicla entonces el Fc a la superficie celular. Una vez se abre el compartimento al espacio extracelular, el mayor pH, ~7,4, induce la liberación de Fc de nuevo a la sangre. En ratones, Dall' Acqua et al. mostraron que los mutantes Fc con unión incrementada a FcRn a pH 6 y pH 7,4 tenían realmente concentraciones séricas reducidas y la misma vida media que el Fc de tipo salvaje (Dall' Acqua et al. 2002, J. Immunol. 169:5171-5180). La afinidad incrementada de Fc para FcRn a pH 7,4 se piensa que impide la liberación del Fc de nuevo a la sangre. Por lo tanto, las mutaciones en Fc que incrementarán la vida media de Fc *in vivo* incrementarán idealmente la unión a FcRn al pH menor mientras todavía permite la liberación de Fc a pH mayor. El aminoácido histidina cambia su estado de carga en el intervalo de pH de 6,0 a 7,4. Por lo tanto, no es sorprendente encontrar residuos de His en posiciones importantes en el complejo Fc/FcRn (Figura 6.)

20 Un aspecto adicional de la invención es el incremento en la unión a FcRn sobre el tipo salvaje específicamente a pH menor, aproximadamente pH 6,0, para facilitar la unión Fc/FcRn en el endosoma. También se describen variantes de Fc con unión alterada a FcRn y unión alterada a otra clase de receptores de Fc, los FcγR (algunas veces escritos FcγR) ya que se ha mostrado que la unión diferencial a FcγR, particularmente unión incrementada a FcγRIIIb y unión disminuida a FcγRIIb, resulta en una eficacia incrementada.

### 25 Definiciones

Con el fin de que la solicitud pueda entenderse más completamente, se muestran a continuación varias definiciones. Se pretende que dichas definiciones engloben equivalentes gramaticales.

30 Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

Por "ADCP" o "fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpo" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.

35 Por "modificación" en la presente memoria se quiere decir una sustitución, inserción, y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica o una alteración en un resto químicamente unido a una proteína. Por ejemplo, una modificación puede ser un carbohidrato alterado o estructura PEG unida a una proteína. Por "modificación de aminoácidos" en la presente memoria se quiere decir una sustitución, inserción, y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica.

40 Por "sustitución de aminoácidos" o "sustitución" en la presente memoria se quiere decir el reemplazo de un aminoácido en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental con otro aminoácido. Por ejemplo, la sustitución E272Y se refiere a un polipéptido variante, en este caso una variante de Fc, en la que el ácido glutámico en la posición 272 se reemplaza con tirosina.

45 Por "inserción de aminoácidos" o "inserción" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la adición de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, -233E o ^233E designa una inserción de ácido glutámico después de la posición 233 y antes de la posición 234. Además, -233ADE o ^233ADE designa una inserción de AlaAspGlu después de la posición 233 y antes de la posición 234.

50 Por "delección de aminoácidos" o "delección" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la eliminación de una secuencia de aminoácidos en una posición particular en una secuencia polipeptídica parental. Por ejemplo, E233- o E233# designa una delección de ácido glutámico en la posición 233. Además, EDA233- o EDA233# designa una delección de la secuencia GluAspAla que empieza en la posición 233.

55 Por "proteína variante" o "variante de proteína", o "variante" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una proteína que se diferencia de una proteína parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Variante de proteína puede referirse a la proteína en sí misma, a una composición que comprende la

proteína, o a la secuencia de aminoácidos que la codifica. Preferiblemente, la variante de proteína tiene al menos una modificación de aminoácidos comparada con la proteína parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos, y preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparada con la parental. La secuencia de la variante de proteína en la presente memoria poseerá preferiblemente al menos aproximadamente 80% de homología, con una secuencia de proteína parental, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología, más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. La proteína variante puede referirse a la proteína variante en sí misma, a composiciones que comprenden la variante de proteína, o a la secuencia de ADN que la codifica. De acuerdo con esto, por "variante de anticuerpo" o "anticuerpo variante" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un anticuerpo que se diferencia de un anticuerpo parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, "variante de IgG" o "IgG variante" tal y como se usa en la presente memoria quiere decir un anticuerpo que se diferencia de una IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos, y "variante de inmunoglobulina" o "inmunoglobulina variante" tal y como se usa en la presente memoria quiere decir una secuencia de inmunoglobulina que se diferencia de una secuencia de inmunoglobulina parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. "Variante de Fc" o "Fc variante" tal y como se usa en la presente memoria quiere decir una proteína que comprende una modificación en un dominio Fc. Las variantes de Fc de la presente invención se definen según las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, I332E es una variante de Fc con la sustitución I332E respecto al polipéptido Fc parental. Asimismo, S239D/I332E/G236A define una variante de Fc con las sustituciones S239D, I332E, y G236A respecto al polipéptido Fc parental. La identidad del aminoácido WT puede no especificarse, en cuyo caso la variante mencionada anteriormente se refiere como 239D/332E/236A. Se indica que el orden en el que se proporcionan las sustituciones es arbitrario, es decir, que, por ejemplo, S239D/I332E/G236A es la misma variante de Fc que G236A/S239D/I332E, y así sucesivamente. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es según el índice EU o el esquema de numeración EU (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El índice EU o índice EU como en Kabat o el esquema de numeración EU se refiere a la numeración del anticuerpo EU (Edelman et al., 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63:78-85.) La modificación puede ser una adición, delección, o sustitución. Las sustituciones pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. Las variantes pueden comprender aminoácidos no naturales. Los ejemplos incluyen US6586207; WO 98/48032; WO 03/073238; US2004-0214988A1; WO 05/35727A2; WO 05/74524A2; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027; J. W. Chin, y P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 11:1135-1137; J. W. Chin, et al., (2002), PICAS United States of America 99:11020-11024; y, L. Wang, y P. G. Schultz, (2002), Chem. 1-10.

Tal y como se usa en la presente memoria, "proteína" en la presente memoria significa al menos dos aminoácidos unidos covalentemente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. El grupo peptídico puede comprender aminoácidos naturales y enlaces peptídicos, o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, "análogos", tales como peptoides (véase Simon et al., PNAS USA 89(20):9367 (1992)). Los aminoácidos pueden ser naturales o no naturales; como apreciarán los expertos en la técnica. Por ejemplo, homo-fenilalanina, citrulina, y norleucina se consideran aminoácidos para los propósitos de la invención, y pueden utilizarse aminoácidos configurados en D y L (R o S). Las variantes de la presente invención pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, por ejemplo, las tecnologías desarrolladas por Schultz et al., incluyendo pero no limitado a los métodos descritos por Cropp y Shultz, 2004, Trends Genet. 20(12):625-30, Anderson et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA 101(2):7566-71, Zhang et al., 2003, 303(5656):371-3, y Chin et al., 2003, Science 301(5635):964-7. Además, los polipéptidos pueden incluir derivatización sintética de una o más cadenas laterales o extremos, glicosilación, PEGilación, permutación circular, ciclación, conectores a otras moléculas, fusión a proteínas o dominios de proteínas, y adición de etiquetas o marcadores peptídicos.

Por "residuo" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, Asparagina 297 (también referida como Asn297, también referida como N297) es un residuo en el anticuerpo IgG1 humano.

Por "Fab" o "región Fab" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina VH, CH1, VL, y CL. Fab puede referirse a esta región aisladamente, o esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fab.

Por "modificación de subclase de IgG" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una modificación de aminoácidos que convierte un aminoácido de un isotipo de IgG en el aminoácido correspondiente en un isotipo IgG diferente, alineado. Por ejemplo, como IgG1 comprende una tirosina e IgG2 una fenilalanina en la posición EU 296, una sustitución F296Y en IgG2 se considera una modificación de subclase de IgG.

Por "modificación no natural" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una modificación de aminoácidos que no es isotópica. Por ejemplo, como ninguna de las IgG comprende un ácido glutámico en la posición 332, la sustitución I332E en IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 se considera una modificación no natural.

Por "aminoácido" e "identidad de aminoácidos" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir uno de los 20 aminoácidos naturales o cualesquiera análogos no naturales que pueden estar presentes en una posición específica, definida.

Por "función efectora" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir en evento bioquímico que resulta de la interacción de una región Fc de anticuerpo con un receptor o ligando Fc. Las funciones efectoras incluyen pero no están limitadas a ADCC, ADCP, y CDC.

5 Por "célula efectora" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una célula del sistema inmune que expresa uno o más receptores Fc y media una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen pero no están limitadas a monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos granulares grandes, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK), y células  $\gamma\delta$ T, y pueden ser de cualquier organismo incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos.

10 Por "ligando de Fc de IgG" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo IgG para formar un complejo Fc / ligando de Fc. Los ligandos de Fc incluyen pero no están limitados a Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ R, Fc $\gamma$ R, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A *staphylococcal*, proteína G *streptococcal*, y Fc $\gamma$ R viral. Los ligandos de Fc también incluyen homólogos del receptor Fc (FcRH), que son una familia de receptores Fc que son homólogos a los Fc $\gamma$ R (Davis et al., 2002, Immunological Reviews 190:123-136). Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc. Los ligandos particulares de Fc de IgG son FcRn y receptores gamma Fc. Por "ligando de Fc" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc / ligando de Fc.

20 Por "receptor gamma de Fc", "Fc $\gamma$ R" o "Fc $\gamma$ gammaR" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir cualquier miembro de la familia de proteínas que se unen a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada por un gen Fc $\gamma$ R. En los seres humanos, esta familia incluye pero no está limitada a Fc $\gamma$ RI (CD64), incluyendo las isoformas Fc $\gamma$ RIa, Fc $\gamma$ RIb, y Fc $\gamma$ RIc; Fc $\gamma$ RII (CD32), incluyendo las isoformas Fc $\gamma$ RIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), Fc $\gamma$ RIIb (incluyendo Fc $\gamma$ RIIb-1 y Fc $\gamma$ RIIb-2), y Fc $\gamma$ RIIc; y Fc $\gamma$ RIII (CD16), incluyendo las isoformas Fc $\gamma$ RIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y Fc $\gamma$ RIIIb (incluyendo los alotipos Fc $\gamma$ RIIIb-NA1 y Fc $\gamma$ RIIIb-NA2) (Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65), así como cualquier Fc $\gamma$ R humano no descubierto o isoformas o alotipos de Fc $\gamma$ R. Un Fc $\gamma$ R puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Los Fc $\gamma$ R de ratón incluyen pero no están limitados a Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16), y Fc $\gamma$ RIII-2 (CD16-2), así como cualquier Fc $\gamma$ R de ratón no descubierto o isoformas o alotipos de Fc $\gamma$ R.

30 Por "FcRn" o "receptor neonatal de Fc" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una proteína que se une a la región Fc del anticuerpo IgG y está codificada al menos en parte por un gen FcRn. El FcRn puede ser de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a seres humanos, ratones, ratas, conejos, y monos. Como se conoce en la técnica, la proteína FcRn funcional comprende dos polipéptidos, referidos frecuentemente como la cadena pesada y la cadena ligera. La cadena ligera es beta-2-microglobulina y la cadena pesada está codificada por el gen FcRn. A no ser que se indique otra cosa en la presente memoria, FcRn o una proteína FcRn se refiere al complejo de la cadena pesada de FcRn con beta-2-microglobulina. Las secuencias de interés particular de FcRn se muestran en las Figuras, particularmente las especies humanas.

40 Por "polipéptido parental" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un polipéptido no modificado que posteriormente se modifica para generar una variante. El polipéptido parental puede ser un polipéptido natural, o una variante o versión obtenida por ingeniería de un polipéptido natural. Polipéptido parental puede referirse al polipéptido en sí mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido parental, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. De acuerdo con esto, por "inmunoglobulina parental" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un polipéptido de inmunoglobulina no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo parental" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante. Debe indicarse que "anticuerpo parental" incluye anticuerpos producidos recombinantemente comerciales conocidos como se resalta más adelante.

Por "posición" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o según un formato establecido, por ejemplo el índice EU como en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en el anticuerpo IgG1 humano.

50 Por "antígeno diana" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la molécula que se une específicamente por la región variable de un anticuerpo dado. Un antígeno diana puede ser una proteína, carbohidrato, lípido, u otro compuesto químico.

Por "célula diana" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una célula que expresa un antígeno diana.

55 Por "región variable" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes V $\kappa$ , V $\lambda$ , y/o V $H$  que componen los loci genéticos de la cadena kappa, lambda, y pesada, respectivamente, de una inmunoglobulina.

Por "de tipo salvaje o WT" en la presente memoria se quiere decir una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente.

5 La presente invención está dirigida a anticuerpos que presentan unión moduladora a FcRn (incluyendo la modulación unión incrementada así como disminuida). Por ejemplo, en algunos casos, la unión incrementada resulta en reciclado celular del anticuerpo y por lo tanto vida media incrementada, por ejemplo para anticuerpos terapéuticos. Alternativamente, una unión a FcRn disminuida es deseable, por ejemplo, para anticuerpos de diagnóstico o anticuerpos terapéuticos que contienen radiomarcadores. Además, los anticuerpos que presentan unión incrementada a FcRn y unión alterada a otros receptores Fc, por ejemplo FcγR encuentran uso en la presente invención. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona anticuerpos.

#### *Anticuerpos*

15 La presente solicitud está dirigida a anticuerpos que incluyen modificaciones de aminoácidos que modulan la unión a FcRn. Son particularmente interesantes los anticuerpos que comprenden mínimamente una región Fc, o variante funcional de ésta, que presenta afinidad de unión incrementada para FcRn a pH disminuido, y que no presentan unión sustancialmente alterada a pH mayor.

20 Las unidades estructurales de anticuerpos tradicionales comprenden típicamente un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto típicamente por dos parejas idénticas de cadenas polipeptídicas, teniendo cada pareja una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitado a IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitado a, IgM1 e IgM2. Así, "isotipo" tal y como se usa en la presente memoria quiere decir cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definida por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos conocidos de inmunoglobulina humana son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE.

25 La parte amino terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsable del reconocimiento del antígeno. En la región variable, se agrupan tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y cadena ligera para formar un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se refiere como una región determinante de la complementariedad (de aquí en adelante referido como una "CDR"), en la que la variación en la secuencia de aminoácidos es muy significativa.

30 La parte carboxi terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Kabat et al. recogieron numerosas secuencias primarias de las regiones variables de cadenas pesadas y cadenas ligeras. Tomando como base el grado de conservación de las secuencias, clasificaron secuencias primarias individuales en la CDR y el marco e hicieron una lista de éstas (véase SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5a edición, NIH publication, No. 91-3242, E.A. Kabat et al.).

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

40 Otro tipo de dominio Ig de la cadena pesada es el dominio bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" en la presente memoria se quiere decir el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG empieza en el residuo EU posición 237. Así, para IgG la bisagra del anticuerpo se define en la presente memoria para incluir las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en el que la numeración es según el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra menor, con la "bisagra menor" refiriéndose generalmente a las posiciones 226 ó 230.

45 De interés particular en la presente invención son las regiones Fc. Por "Fc" o "región Fc", tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de región constante y, en algunos casos, parte de la bisagra. Así, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgA, IgD, e IgG, y los tres últimos dominios de inmunoglobulina de región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal respecto a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, como se ilustra en la Figura 1, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cg2 y Cg3) y la región de bisagra menor entre Cgamma1 (Cg1) y

Cgamma2 (Cg2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de IgG humana se define habitualmente para incluir los residuos C226 o P230 en su extremo carboxilo, en el que la numeración es según el índice EU como en Kabat. Fc puede referirse a esta región aisladamente, o esta región en el contexto de un polipéptido Fc, como se describe más adelante. Por "polipéptido Fc" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones Fc, Fc aislados, y fragmentos de Fc.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. Por "anticuerpo de longitud completa" en la presente memoria se quiere decir la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variable y constante, incluyendo una o más modificaciones como se resalta en la presente memoria.

Alternativamente, los anticuerpos pueden tener una variedad de estructuras, incluyendo, pero no limitado a, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (algunas veces referidos en la presente memoria como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (algunas veces referidas como "conjugados de anticuerpos"), y fragmentos de cada uno, respectivamente.

#### Fragmentos de Anticuerpo

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

Los fragmentos de anticuerpo específicos de la descripción incluyen, pero no están limitados a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546) que consiste en una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv de cadena única(scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se unen por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426, Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) Fv de cadena única biespecífico (WO 03/11161) y (ix) "fragmentos divalentes" o "fragmentos trivalentes", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448). Los fragmentos de anticuerpo pueden estar modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse por la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, Nature Biotech. 14:1239-1245).

#### Anticuerpos Quiméricos y Humanizados

En algunas realizaciones, los componentes de soporte pueden ser una mezcla de diferentes especies. Como tal, si la proteína es un anticuerpo, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. En general, tanto los "anticuerpos quiméricos" como los "anticuerpos humanizados" se refieren a los anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, los "anticuerpos quiméricos" comprenden tradicionalmente región o regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano. Los "anticuerpos humanizados" se refieren generalmente a anticuerpos no humanos en los que se han cambiado las regiones marco de dominio variable por secuencias encontradas en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, el anticuerpo completo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a dicho anticuerpo excepto en sus CDR. Las CDR, algunas de las cuales están codificadas por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, cuya especificidad es determinada por las CDR injertadas. La creación de dichos anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 92/11018, Jones, 1986, Nature 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536. La "retromutación" de residuos marco aceptores seleccionados a residuos donantes correspondientes se requiere frecuentemente para volver a adquirir la afinidad que se pierde en la construcción injertada inicial (US 5530101; US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 6180370; US 5859205; US 5821337; US 6054297; US 6407213). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y así comprenderá típicamente una región Fc humana. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse usando ratones con un sistema inmune modificado por ingeniería genéticamente. Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654. En la técnica se conoce una variedad de técnicas y métodos para humanizar y remodelar anticuerpos no humanos (Véase Tsurushita y Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA), y las referencias citadas en éstas). Los métodos de humanización incluyen pero no están limitados a los métodos descritos en Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res.57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de regiones variables de anticuerpos no humanos pueden incluir métodos de

modificación de superficie, como se describe por ejemplo en Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973. En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Los métodos basados en estructura pueden emplearse para la humanización y maduración por afinidad, por ejemplo como se describe en USSN 11/004,590. Los métodos basados en selección pueden emplearse para humanizar y/o madurar por afinidad regiones variables de anticuerpo, incluyendo pero no limitados a métodos descritos en Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden implicar el injerto sólo de partes de las CDR, incluyendo pero no limitado a métodos descritos en USSN 09/810,510; Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084.

#### *Anticuerpos Biespecíficos*

En una realización, los anticuerpos de la invención anticuerpo multiespecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, también referido a veces como "fragmentos divalentes". Éstos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los fragmentos divalentes pueden fabricarse de una variedad de maneras conocidas en la técnica (Holliger y Winter, 1993, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449), por ejemplo, pueden prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos.

#### *Minicuerpos*

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

#### *Anticuerpos Humanos*

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano con al menos una modificación como se resalta en la presente memoria. "Anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano completo" se refiere a un anticuerpo humano que tiene la secuencia génica de un anticuerpo derivado de un cromosoma humano con las modificaciones resaltadas en la presente memoria.

#### *Fusiones de Anticuerpo*

En una realización, los anticuerpos de la invención son proteínas de fusión de anticuerpo (referidas algunas veces en la presente memoria como un "conjugado de anticuerpo"). Un tipo de fusiones de anticuerpo comprende fusiones Fc, que unen la región Fc con una pareja de conjugado. Por "fusión de Fc" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una proteína en la que uno o más polipéptidos están unidos de manera operativa a una región Fc. Fusión Fc en la presente memoria quiere que sea sinónimo con los términos "inmuno adhesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina receptor" (algunas veces con guiones) tal y como se usa en la técnica anterior (Chamow et al., 1996, Trends Biotechnol 14:52-60; Ashkenazi et al., 1997, Curr Opin Immunol 9:195-200). Una fusión de Fc combina la región Fc de una inmunoglobulina con una pareja de fusión, que en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña. Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc. Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no están limitadas a, la región variable de cualquier anticuerpo, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión que son moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirige la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, que está implicada en enfermedad. Así, las variantes de IgG pueden unirse a una o más parejas de fusión. En una realización alternativa, la variante de IgG se conjuga o se une de manera operativa a otro compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico puede ser un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radioisótopo, una citoquina, u otro agente terapéuticamente activo. La IgG puede unirse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilen glicol, polipropilén glicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilen glicol y polipropilén glicol.

Además de las fusiones de Fc, las fusiones de anticuerpo incluyen la fusión de la región constante de la cadena pesada con una o más parejas de fusión (de nuevo incluyendo la región variable de cualquier anticuerpo), mientras otras fusiones de anticuerpo son sustancialmente o completamente anticuerpos de longitud completa con parejas de fusión. En una realización, un papel de la pareja de fusión es mediar la unión a la diana, y así es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo (y de hecho pueden ser). Virtualmente cualquier proteína o molécula pequeña puede unirse a Fc para generar una fusión de Fc (o fusión de anticuerpo). Las parejas de fusión de proteínas pueden incluir, pero no están limitadas a, la región de unión a diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima, una citoquina, una quimioquina, o alguna otra proteína o dominio de proteína. Las parejas de fusión que son moléculas pequeñas pueden incluir cualquier agente terapéutico que dirige la fusión de Fc a una diana terapéutica. Dichas dianas pueden ser cualquier molécula, preferiblemente un receptor extracelular, que está implicada en enfermedad.

La pareja del conjugado puede ser proteínica o no proteínica; generándose la última generalmente usando grupos funcionales en el anticuerpo y en la pareja del conjugado. Por ejemplo, en la técnica se conocen conectores; por ejemplo, conectores homo o hetero-bifuncionales como se conoce bien (véase, 1994 catálogo de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre agentes de entrecruzamiento, páginas 155-200).

- 5 Los conjugados adecuados incluyen, pero no están limitados a, marcadores como se describe más adelante, fármacos y agentes citotóxicos incluyendo, pero no limitado a, fármacos citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) o toxinas o fragmentos activos de dichas toxinas. Las toxinas adecuadas y sus fragmentos correspondientes incluyen cadena A de difteria, cadena A de exotoxina, cadena A de ricina, cadena A de abrina, curcina, crotina, fenomicina, enomicina y semejantes. Los agentes citotóxicos también incluyen radioquímicos  
10 preparados por conjugación de radioisótopos a anticuerpos, o unión de un radionúclido a un agente quelante que se ha unido covalentemente al anticuerpo. Las realizaciones adicionales utilizan caliqueamicina, auristatinas, geldanamicina, maitansina, y duocarmicinas y análogos; para los últimos, véase U.S. 2003/0050331A1.

#### *Modificaciones covalentes de Anticuerpos*

- 15 Las modificaciones covalentes de anticuerpos se incluyen en el alcance de esta invención, y se hacen, generalmente, pero no siempre, después de la traducción. Por ejemplo, varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo se introducen en la molécula haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizador orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C terminales.

- 20 Lo más comúnmente los residuos cisteinil se hacen reaccionar con  $\alpha$ -haloacetatos (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinil también pueden derivatizarse por reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alkilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y semejantes.

- 25 Los residuos histidil se derivatizan por reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidil. También es útil bromuro de para-bromofenacilo; la reacción se realiza preferiblemente en 0,1M cacodilato de sodio a pH 6,0.

- 30 Los residuos lisinil y amino terminales se hacen reaccionar con ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinil. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenzenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

- 35 Los residuos arginil se modifican por reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo épsilon-amino de arginina.

- 40 La modificación específica de residuos tirosil puede hacerse, con interés particular en introducir marcadores espectrales en residuos de tirosil por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, se usan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosil se yodan usando 1251 ó 1311 para preparar proteínas marcadas para uso en radioinmunoensayo, siendo adecuado el método de cloramina T descrito anteriormente.

- Los grupos laterales carboxil (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente por reacción con carbodiimidas ( $R^1-N=C=N-R^1$ ), en las que R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida ó 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartil y glutamil se convierten en residuos asparaginil y glutaminil por reacción con iones amonio.

- 45 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para entrecruzar anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en una variedad de métodos, además de los métodos descritos más adelante. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), y maleimidias  
50 bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivatización tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rinden intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. Alternativamente, se emplean matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las Pat. U.S. Nos. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440, para la inmovilización de las proteínas.

- 55 Los residuos glutaminil y asparaginil se desamidán frecuentemente a los residuos glutamil y aspartil correspondientes, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos se encuentra en el alcance de esta invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos seril o treonil, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 ), acetilación de la amina N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

## 5 Glicosilación

Otro tipo de modificación covalente es glicosilación. En otra realización, las variantes de IgG descritas en la presente memoria pueden modificarse para incluir una o más glicofomas preparadas por ingeniería. Por "glicofoma preparada por ingeniería" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una composición de carbohidrato que está unida covalentemente a una IgG, en la que dicha composición de carbohidrato se diferencia químicamente de la de una IgG parental. Las glicofomas preparadas por ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo pero no limitado a aumentar o reducir la función efectora. Las glicofomas preparadas por ingeniería pueden generarse por una variedad de métodos conocidos en la técnica (Umaña et al., 1999, *Nat Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001, *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473; US 6.602.684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT WO 00/61739A1; PCT WO 01/29246A1; PCT WO 02/31140A1; PCT WO 02/30954A1; (tecnología Potelligent® [Biowa, Inc., Princeton, NJ]; G)ycomaB® glycosylation engineering technology [Glycart Biotechnology AG, Zurich, Switzerland]). Muchas de estas técnicas se basan en controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o bisectados que están unidos covalentemente a la región Fc, por ejemplo expresando una IgG en varios organismos o líneas celulares, preparada por ingeniería o de otra forma (por ejemplo, células CHO Lec-13 o células de hibridoma YB2/O de rata), regulando las enzimas implicadas en la ruta de glicosilación (por ejemplo, FUT8 [ $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa] y/o  $\beta$ 1-4- N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), o modificando carbohidrato(s) después de que se ha expresado la IgG. La glicofoma preparada por ingeniería se refiere típicamente al diferente carbohidrato u oligosacárido; así, una variante de IgG, por ejemplo un anticuerpo o fusión de Fc, puede incluir una glicofoma preparada por ingeniería. Alternativamente, la glicofoma preparada por ingeniería puede referirse a la variante de IgG que comprende el diferente carbohidrato u oligosacárido. Como se conoce en la técnica, los patrones de glicosilación pueden depender tanto de la secuencia de la proteína (por ejemplo, la presencia o ausencia de residuos de aminoácidos de glicosilación particulares, discutido más adelante), como de la célula u organismo huésped en el que se produce la proteína. Los sistemas de expresión particulares se discuten más adelante.

La glicosilación de polipéptidos está típicamente ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tri-péptido 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 resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tri-péptido en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa, a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina ó 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos que contiene una o más de las secuencias de tri-péptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse por la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia de partida (para sitios de glicosilación ligados a O). Para facilitararlo, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se altera preferiblemente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido diana en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para incrementar el número de restos de carbohidrato en el anticuerpo es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos a la proteína. Estos procedimientos son ventajosos porque no requieren la producción de la proteína en una célula diana que tiene capacidades de glicosilación para glicosilación ligada a N y O. Dependiendo del modo de acoplamiento usado, el o los azúcares pueden unirse a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO 87/05330 y en Aplin y Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, p. 259-306.

La eliminación de restos de carbohidrato presentes en el anticuerpo de partida puede conseguirse químicamente o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere la exposición de la proteína al compuesto ácido trifluorometanosulfónico, o un compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en la escisión de la mayor parte o de todos los azúcares excepto el azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), mientras se deja el polipéptido intacto. La desglicosilación química está descrita por Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 y por Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. La escisión enzimática de restos de carbohidrato en polipéptidos puede conseguirse por el uso de una variedad de endo y exo-glicosidasas como se describe por Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. La glicosilación en sitios de glicosilación potenciales puede evitarse por el uso del compuesto tunicamicina como se describe por Duskin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. La tunicamicina bloquea la formación de uniones proteína-N-glicósido.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende la unión del anticuerpo a varios polímeros no proteínicos, incluyendo, pero no limitado a, varios polímeros tales como polietilén glicol, polipropilén glicol o polioxialquilenos, de la manera mostrada, por ejemplo, en 2005-2006 Catálogo PEG de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio de internet de Nektar) Patentes US 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337,. Además, como se conoce en la técnica, pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en varias posiciones en el anticuerpo para facilitar la adición de polímeros tales como PEG. Véase, por ejemplo, la Publicación U.S. No. 2005/0114037A1.

#### *Anticuerpos Marcados*

En algunas realizaciones, la modificación covalente de los anticuerpos de la invención comprende la adición de uno o más marcadores. En algunos casos, éstos se consideran fusiones de anticuerpo. El término "grupo marcador" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y pueden usarse para llevar a cabo la presente invención.

En general, los marcadores se encuentran en una variedad de clases, dependiendo del ensayo en el que se van a detectar: a) marcadores isotópicos que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) marcadores magnéticos (por ejemplo, partículas magnéticas); c) restos activos redox; d) marcadores ópticos; grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano,  $\beta$ -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina); e) grupos biotinilados; y f) epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítopo, etc.). En algunas realizaciones, el grupo marcador está acoplado al anticuerpo mediante brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. En la técnica se conocen varios métodos para marcar proteínas y pueden usarse para llevar a cabo la presente invención.

Los marcadores específicos incluyen marcadores ópticos, incluyendo, pero no limitado a, cromóforos, sustancias luminiscentes, siendo los últimos específicos en muchos casos. Los fluoróforos pueden ser bien sustancias fluorescentes de "molécula pequeñas", o sustancias fluorescentes proteínicas.

Por "marcador fluorescente" se quiere decir cualquier molécula que puede detectarse a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no están limitados a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, coumarina, metil-coumarinas, pireno, Malaquita verde, estilbeno, Lucifer Amarillo, Cascade BlueJ, Texas Rojo, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, Oregon verde, los agentes de tinción Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes, Eugene, OR), FITC, Rodamina, y Texas Rojo (Pierce, Rockford, IL), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, PA). Los agentes de tinción ópticos adecuados, incluyendo fluoróforos, se describen en Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland.

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

#### *Variantes de IgG*

En una realización, la invención proporciona proteínas IgG variantes. Como mínimo, las variantes de IgG comprenden un fragmento de anticuerpo que comprende la región CH2-CH3 de la cadena pesada. Además, las variantes de IgG adecuadas comprenden dominios Fc (por ejemplo, incluyendo la región bisagra menor), así como siendo también útiles en la presente invención las variantes de IgG que comprenden la región constante de la cadena pesada (CH1-bisagra-CH2-CH3), todas las cuales pueden fusionarse con parejas de fusión.

Una variante de IgG incluye una o más modificaciones de aminoácidos respecto a un polipéptido IgG parental, en algunos casos respecto a la IgG de tipo salvaje. La variante de IgG puede tener una o más propiedades optimizadas. Una variante de IgG se diferencia en la secuencia de aminoácidos de su IgG parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Así, las variantes de IgG tienen al menos una modificación de aminoácidos comparadas con la parental. Alternativamente, las variantes de IgG pueden tener más de una modificación de aminoácidos comparadas con la parental, por ejemplo de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, y lo más preferiblemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos comparadas con la parental.

Así, las secuencias de las variantes de IgG y aquellas del polipéptido Fc parental son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias variantes de la IgG variante en la presente memoria poseerán aproximadamente 80% de homología con la secuencia variante de IgG parental, preferiblemente al menos aproximadamente 90% de homología, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95% de homología. Las modificaciones pueden hacerse genéticamente usando biología molecular, o pueden hacerse enzimáticamente o químicamente.

#### Antígenos Diana para Anticuerpos

Virtualmente, cualquier antígeno puede ser diana de las variantes de IgG, incluyendo pero no limitado a proteínas, subunidades, dominios, restos, y/o epítomos que pertenecen a la lista siguiente de antígenos diana, que incluye tanto factores solubles tales como citoquinas como factores unidos a membrana, incluyendo receptores transmembrana:

17-IA, 4-1 BB, 4Dc, 6-ceto-PGF1a, 8-iso-PGF2a, 8-oxo-dG, A1 Receptor de Adenosina, A33, ACE, ACE-2, Activina, Activina A, Activina AB, Activina B, Activina C, Activina RIA, Activina RIA ALK-2, Activina RIB ALK-4, Activina RIIA, Activina RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, Adresinas, aFGF, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, alfa-1-antitripsina, antagonista alfa-V/beta-1, ANG, Ang, APAF-1, APE, APJ, APP, APRIL, AR, ARC, ART, Artemina, anti-Id, ASPÁRTICO, Factor natriurético atrial, av/b3 integrina, Axl, b2M, B7-1, B7-2, B7-H, Estimulador de linfocitos B (BlyS), BACE, BACE-1, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, BMP, BMP-2, BMP-2a, BMP-3 Osteogenina, BMP-4 BMP-2b, BMP-5, BMP-6 Vgr-1, BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a, OP-2), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BRK-2, RPK-1, BMPR-II (BRK-3), BMPs, b-NGF, BOK, Bombesina, Factor neurotrófico derivado de hueso, BPDE, BPDE-DNA, BTC, factor de complemento 3 (C3), C3a, C4, C5, C5a, C10, CA125, CAD-8, Calcitonina, AMPc, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno asociado a carcinoma, Catepsina A, Catepsina B, Catepsina C/DPPI, Catepsina D, Catepsina E, Catepsina H, Catepsina L, Catepsina O, Catepsina S, Catepsina V, Catepsina X/Z/P, CBL, CCI, CCK2, CCL, CCL1, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL2, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26, CCL27, CCL28, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9/10, CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD2, CD3, CD3E, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD27L, CD28, CD29, CD30, CD30L, CD32, CD33 (proteínas p67), CD34, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD52, CD54, CD55, CD56, CD61, CD64, CD66e, CD74, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD123, CD137, CD138, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD152, CD164, CEACAM5, CFTR, GMPC, CINC, toxina de *Clostridium botulinum*, toxina de *Clostridium perfringens*, Ckb8-1, CLC, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, COX, C-Ret, CRG-2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1, CX3CR1, CXCL, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, antígeno asociado a tumor de citoqueratina, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, Factor acelerador de degradación, des(1-3)-IGF-I (IGF-1 cerebral), Dhh, digoxina, DNAM-1, ADNasa, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR(ErbB-1), EMA, EMMPRIN, ENA, receptor de endotelina, Encefalinasa, eNOS, Eot, eotaxina1, EpCAM, Efrina B2/ EphB4, EPO, ERCC, E-selectina, ET-1, Factor Iia, Factor VII, Factor VIIIc, Factor IX, proteína de activación de fibroblastos (FAP), Fas, FcR1, FEN-1, Ferritina, FGF, FGF-19, FGF-2, FGF3, FGF-8, FGFR, FGFR-3, Fibrin, FL, FLIP, Flt-3, Flt-4, Hormona estimuladora del folículo, Fractalquina, FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14, CDMP-1), GDF-6 (BMP-13, CDMP-2), GDF-7 (BMP-12, CDMP-3), GDF-8 (Miostatina), GDF-9, GDF-15 (MIC-1), GDNF, GDNF, GFAP, GFRa-1, GFR-alfa1, GFR-alfa2, GFR-alfa3, GITR, Glucagón, Glut 4, glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa), GM-CSF, gp130, gp72, GRO, Factor liberador de hormona del crecimiento, Hapteno (NP-cap o NIP-cap), HB-EGF, HCC, HCMV gB glicoproteína de cubierta, HCMV) gH glicoproteína de cubierta, HCMV UL, Factor de crecimiento hematopoyético (HGF), Hep B gp120, heparanasa, Her2, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), virus del herpes simple (HSV) gB glicoproteína, HSV gD glicoproteína, HGFA, Antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), HIV gp120, HIV IIIB gp 120 V3 bucle, HLA, HLA-DR, HM1.24, HMFG PEM, HRG, Hrk, miosina cardiaca humana, citomegalovirus humano (HCMV), hormona de crecimiento humana (HGH), HVEM, I-309, IAP, ICAM, ICAM-1, ICAM-3, ICE, ICOS, IFNg, Ig, receptor de IgA, IgE, IGF, proteínas de unión a IGF, IGF-1R, IGFBP, IGF-I, IGF-II, IL, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-5R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-18R, IL-23, interferón (INF)-alfa, INF-beta, INF-gamma, Inhibina, iNOS, Cadena A de insulina, Cadena B de insulina, factor de crecimiento semejante a insulina 1, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa4/beta1, integrina alfa4/beta7, integrina alfa5 (alfaV), integrina alfa5/beta1, integrina alfa5/beta3, integrina alfa6, integrina alfa6, integrina beta1, integrina beta2, interferón gamma, IP-10, I-TAC, JE, Calicreína 2, Calicreína 5, Calicreína 6, , Calicreína 11, Calicreína 12, Calicreína 14, Calicreína 15, Calicreína L1, Calicreína L2, Calicreína L3, Calicreína L4, KC, KDR, Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF), laminina 5, LAMP, LAP, LAP (TGF- 1), TGF-1 Latente, TGF-1 Latente bp1, LBP, LDGF, LECT2, Lefty, antígeno Y de Lewis, antígeno relacionado con Y de Lewis, LFA-1, LFA-3, Lfo, LIF, LIGHT, lipoproteínas, LIX, LKN, Lptn, L-Selectina, LT-a, LT-b, LTB4, LTBP-1, Tensioactivo pulmonar, Hormona Luteinizante, Receptor Beta de Linfotóxina, Mac-1, MAdCAM, MAG, MAP2, MARC, MCAM, MCAM, MCK-2, MCP, M-CSF, MDC, Mer, METALOPROTEASAS, receptor MGDF, MGMT, MHC (HLA-DR), MIF, MIG, MIP, MIP-1-alfa, MK, MMAC1, MMP, MMP-1, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-2, MMP-24, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MPIF, Mpo, MSK, MSP, mucina (Muc1), MUC18, Sustancia inhibidora mulleriana, Mug, MuSK, NAIP, NAP, NCAD, N-Cadherina, NCA 90, NCAM, NCAM, Nepriliasina, Neurotrofina-3,-4, o -6, Neurturina, Factor de crecimiento neuronal (NGF), NGFR, NGF-beta, nNOS, NO, NOS, Npn, NRG-3, NT, NTN, OB, OGG1, OPG, OPN, OSM, OX40L, OX40R, p150, p95, PADPr, Hormona paratiroidea, PARC,

PARP, PBR, PBSF, PCAD, P-Cadherina, PCNA, PDGF, PDGF, PDK-1, PECAM, PEM, PF4, PGE, PGF, PG12, PGJ2, PIN, PLA2, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), PIGF, PLP, PP14, Proinsulina, Prorelaxina, Proteína C, PS, PSA, PSCA, antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), PTEN, PTHrp, Ptk, PTN, R51, RANK, RANKL, RANTES, RANTES, Cadena A de relaxina, Cadena B de relaxina, renina, virus sincitial respiratorio (RSV) F, RSV Fgp, Ret, Factores reumatoides, RLIP76, RPA2, RSK, S100, SCF/KL, SDF-1, SERINA, Albúmina sérica, sFRP-3, Shh, SIGIRR, SK-1, SLAM, SLPI, SMAC, SMDf, SMOH, SOD, SPARC, Stat, STEAP, STEAP-II, TACE, TACI, TAG-72 (glicoproteína asociada a tumor-72), TARC, TCA-3, receptores de células T (por ejemplo, receptor de células T alfa/beta), TdT, TECK, TEM1, TEM5, TEM7, TEM8, TERT, fosfatas alcalina semejante a PLAP testicular, TfR, TGF, TGF-alfa, TGF-beta, TGF-beta con especificidad general, TGF-beta RI (ALK-5), TGF-beta RII, TGF-beta RIIB, TGF-beta RIII, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, Trombina, Ck-1 de timo, Hormona estimuladora del tiroides, Tie, TIMP, TIQ, Factor tisular, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, TNF, TNF-alfa, TNF-alfa beta, TNF-beta2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2, DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5, KILLER, TRICK-2A, TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1, LIT, TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2, TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R, TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF, TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR, HveA, LIGHT R, TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ, TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a, p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b, p75-80), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII, TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35, TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1, APT1, CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68, TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1BB CD137, ILA), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFRSF25 (DR3 Apo-3, LARD, TR-3, TRAMP, WSL-1), TNFSF10 (TRAIL Apo-2 Ligando, TL2), TNFSF11 (TRANCE/RANK Ligando ODF, OPG Ligando), TNFSF12 (TWEAK Apo-3 Ligando, DR3 Ligando), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS, TALL1, THANK, TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT HVEM Ligando, LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (GITR Ligando AITR Ligando, TL6), TNFSF1A (TNF-a Conectina, DIF, TNFSF2), TNFSF1B (TNF-b LTa, TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC, p33), TNFSF4 (OX40 Ligando gp34, TXGP1), TNFSF5 (CD40 Ligando CD154, gp39, HIGM1, IMD3, TRAP), TNFSF6 (Fas Ligando Apo-1 Ligando, APT1 Ligando), TNFSF7 (CD27 Ligando CD70), TNFSF8 (CD30 Ligando CD153), TNFSF9 (4-1BB Ligando CD137 Ligando), TP-1, t-PA, Tpo, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, factor de transferencia, TRF, Trk, TROP-2, TSG, TSLP, antígeno asociado a tumor CA 125, antígeno asociado a tumor que expresa carbohidrato relacionado con Y de Lewis, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, Uroquinasa, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-Cadherina, VE-cadherina-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGF, VEGFR, VEGFR-3 (flt-4), VEG1, VIM, Antígenos virales, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR integrina, factor de von Willebrands, WIF-1, WNT1, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9A, WNT9B, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, XCL1, XCL2, XCR1, XCR1, XEDAR, XIAP, XPD, y receptores para hormonas y factores de crecimiento.

Un experto en la técnica apreciará que la lista de dianas mencionada anteriormente se refiere no sólo a proteínas y biomoléculas específicas, sino a la ruta o rutas bioquímicas que las comprenden. Por ejemplo, la referencia a CTLA-4 como un antígeno diana implica que los ligandos y receptores que componen la ruta co-estimuladora de células T, incluyendo CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, y cualesquiera otros ligandos o receptores no descubiertos que se unen a estas proteínas, también son dianas. Así, diana se usa en la presente memoria para hacer referencia no sólo a una biomolécula específica, sino al conjunto de proteínas que interaccionan con dicha diana y a los miembros de la ruta bioquímica a la que pertenece dicha diana. Un experto en la técnica apreciará además que cualesquiera de los antígenos diana mencionados anteriormente, los ligandos o receptores que los unen, u otros miembros de su ruta bioquímica correspondiente, pueden unirse de manera operativa a las variantes de Fc de la presente invención con el fin de generar una fusión Fc. Así, por ejemplo, una fusión Fc que está dirigida a EGFR podría construirse uniendo de manera operativa una variante de Fc a EGF, TGF-b, o cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que se una a EGFR. De acuerdo con esto, una variante de Fc de la presente invención podría unirse de manera operativa a EGFR con el fin de generar una fusión Fc que se une a EGF, TGF-b, o cualquier otro ligando, descubierto o no descubierto, que se una a EGFR. Así, virtualmente cualquier polipéptido, ya sea un ligando, receptor, o alguna otra proteína o dominio de proteína, incluyendo pero no limitado a las dianas mencionadas anteriormente y las proteínas que componen sus rutas bioquímicas correspondientes, puede unirse de manera operativa a las variantes de Fc de la presente invención para desarrollar una fusión Fc.

La elección de antígeno adecuado depende de la aplicación deseada. Para el tratamiento anti-canceroso es deseable tener una diana cuya expresión esté restringida a las células cancerosas. Algunas dianas que se ha demostrado especialmente idóneas para terapia de anticuerpo son aquellas con funciones de señalización. Otros anticuerpos terapéuticos ejercen sus efectos bloqueando la señalización del receptor inhibiendo la unión entre un receptor y su ligando cognado. Otro mecanismo de acción de anticuerpos terapéuticos es causar la regulación a la baja de receptores. Otros anticuerpos no funcionan por señalización a través de su antígeno diana. En algunos casos, se usan anticuerpos dirigidos frente a agentes de enfermedades infecciosas.

En una realización, las variantes de Fc de la presente invención se incorporan en un anticuerpo frente a una citoquina. Alternativamente, las variantes de Fc se fusionan o conjugan con una citoquina. Por "citoquina" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan en otra célula como mediadores intercelulares. Por ejemplo, como se describe en Penichet et al., 2001, J Immunol Methods 248:91-101, las citoquinas pueden fusionarse a anticuerpo para proporcionar una matriz

de propiedades deseables. Los ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas están la hormona de crecimiento tal como la hormona de crecimiento humana, N-metionil hormona de crecimiento humana, y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteicas tales como hormona estimuladora del folículo (FSH), hormona estimuladora del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral alfa y beta; sustancia inhibidora muleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento del endotelio vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor de crecimiento semejante a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores oseoinductores; interferones tales como interferón-alfa, beta, y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; IL-15, un factor de un factor de necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; C5a; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y ligando kit (KL). Tal y como se usa en la presente memoria, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante, y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

Las citoquinas y dianas solubles, tales como los miembros de la superfamilia TNF, son dianas preferidas para uso con las variantes de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos anti-VEGF, anti-CTLA-4, y anti-TNF, o fragmentos de éstos, son anticuerpos particularmente buenos para el uso de variantes de Fc que incrementan la unión a FcRn. Los terapéuticos frente a estas dianas están implicados frecuentemente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y requieren múltiples inyecciones durante periodos largos de tiempo. Por lo tanto, se prefieren particularmente vidas medias séricas más largas y tratamientos menos frecuentes, proporcionado por las variantes de la presente invención.

Varios anticuerpos y fusiones Fc que están aprobados para uso, en ensayos clínicos, o en desarrollo pueden beneficiarse de las variantes de Fc de la presente invención. Estos anticuerpos y fusiones de Fc se refieren en la presente memoria como "productos y candidatos clínicos". Así, en una realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un rango de productos y candidatos clínicos. Por ejemplo, varios anticuerpos que tienen como diana CD20 pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, US 5.736.137), un anticuerpo quimérico anti-CD20 aprobado para tratar linfoma no de Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 que está siendo desarrollado actualmente por Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en US 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), HumaLYM (Intracel), y PRO70769 (PCT/US2003/040426, titulado "Immunoglobulin Variants and Uses Thereof"). Varios anticuerpos que tienen como diana miembros de la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico, incluyendo EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), pueden beneficiarse de los polipéptidos Fc de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que es sustancialmente similar a trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase, por ejemplo, US 5.677.171), un anticuerpo humanizado anti-Her2/neu aprobado para tratar cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™), que está siendo desarrollado actualmente por Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en US 4.753.894; cetuximab (Erbix®, Imclone) (US 4.943.533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo quimérico anti-EGFR en ensayos clínicos para una variedad de cánceres; ABX-EGF (US 6.235.883), que está siendo desarrollado actualmente por Abgenix-ImmuneX-Amgen; HuMax-EGF (USSN 10/172.317), que está siendo desarrollado actualmente por Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (US 5.558.864; Murthy et al. 1987, Arch Biochem Biophys. 252(2):549-60; Rodeck et al., 1987, J Cell Biochem. 35(4):315-20; Kettleborough et al., 1991, Protein Eng. 4(7):773-83); ICR62 (Institute of Cancer Research) (PCT WO 95/20045; Modjtahedi et al., 1993, J. Cell Biophys. 1993, 22(1-3):129-46; Modjtahedi et al., 1993, Br J Cancer. 1993, 67(2):247-53; Modjtahedi et al, 1996, Br J Cancer, 73(2):228-35; Modjtahedi et al, 2003, Int J Cancer, 105(2):273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canadá y Centro de Inmunología Molecular, Cuba (US 5.891.996; US 6.506.883; Mateo et al, 1997, Immunotechnology, 3(1):71-81); mAb-806 (Ludwig Institute for Cancer Research, Memorial Sloan-Kettering) (Jungbluth et al. 2003, Proc Natl Acad Sci USA. 100(2):639-44); KSB-102 (KS Biomedix); MR1-1 (IVAX, National Cancer Institute) (PCT WO 0162931A2); y SC100 (Scancell) (PCT WO 01/88138). En otra realización preferida, los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath®, Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una variedad de anticuerpos o fusiones Fc que son sustancialmente similares a otros productos y candidatos clínicos, incluyendo pero no limitado a muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetán (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión Fc anti-LFA-3 desarrollada por Biogen), abciximab (ReoPro®), desarrollado por Centocor/Lilly, basiliximab (Simulect®), desarrollado por Novartis, palivizumab (Synagis®), desarrollado por MedImmune, infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Centocor, adalimumab (Humira®), un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Abbott, Humicade™, un anticuerpo anti-TNF alfa desarrollado por Celltech, etanercept (Enbrel®), una fusión Fc anti-TNF alfa desarrollada por ImmuneX/Amgen, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que está siendo desarrollado por Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que está

siendo desarrollado por Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está siendo desarrollado por Abgenix, Pemtumomab (R1549, 90Y-muHMFG1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, Therex (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que está siendo desarrollado por Antisoma, AngioMab (AS1405), que está siendo desarrollado por Antisoma, HuBC-1, que está siendo desarrollado por Antisoma, Thioplatin (AS1407) que está siendo desarrollado por Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que está siendo desarrollado por Biogen, VLA-1 mAb, un anticuerpo anti-VLA-1 integrina que está siendo desarrollado por Biogen, LTBR mAb, un anticuerpo anti-receptor de linfotóxina beta (LTBR) que está siendo desarrollado por Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGF-β2 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, J695, un anticuerpo anti-IL-12 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGFβ1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B™ un anticuerpo anti-Blys que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que está siendo desarrollado por Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, Inc., Avastin™ (bevacizumab, rhuMAB-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que está siendo desarrollado por Genentech, un anticuerpo anti-familia de receptores HER que está siendo desarrollado por Genentech, Anti-Factor Tisular (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular que está siendo desarrollado por Genentech, Xolair™ (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que está siendo desarrollado por Genentech, Raptiva™ (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que está siendo desarrollado por Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (antiguamente LDP-02), que está siendo desarrollado por Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I que está siendo desarrollado por Genmab y Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Lymphoma, que está siendo desarrollado por Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que está siendo desarrollado por Genmab, IDEC-131, y anticuerpo anti-CD40L que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anticuerpo anti-CD23 que está siendo desarrollado por IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti-factor de migración de macrófagos (MIF) que están siendo desarrollados por IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti-idiotípico que está siendo desarrollado por Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que está siendo desarrollado por Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que está siendo desarrollado por Imclone, anticuerpos anti-VE cadherina que están siendo desarrollados por Imclone, CEA-Cide™ (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) que está siendo desarrollado por Immunomedics, LymphoCide™ (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que está siendo desarrollado por Immunomedics, AFP-Cide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MyelomaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, LkoCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, ProstaCide, que está siendo desarrollado por Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-060, un anticuerpo anti-CD30 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-070 que está siendo desarrollado por Medarex, MDX-018 que está siendo desarrollado por Medarex, Osidem™ (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 que está siendo desarrollado por Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está siendo desarrollado por Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα que está siendo desarrollado por Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citoquina que está siendo desarrollado por Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1)(CD54) que están siendo desarrollados por MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR-3) que está siendo desarrollado por MorphoSys, Nuvion® (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, HuZAF™, un anticuerpo anti-interferón gamma que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, Anti-Integrina α5β1, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, anti-IL-12, que está siendo desarrollado por Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM que está siendo desarrollado por Xoma, y MLN01, un anticuerpo anti-Integrina Beta2 que está siendo desarrollado por Xoma.

Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden incorporarse en los candidatos y productos clínicos mencionados anteriormente, o en anticuerpos y fusiones Fc que son sustancialmente iguales a ellos. Los polipéptidos Fc de la presente invención pueden incorporarse en versiones de los candidatos y productos clínicos mencionados anteriormente que son humanizados, madurados por afinidad, preparados por ingeniería, o modificados de alguna otra manera.

En una realización los polipéptidos Fc de la presente invención se usan para el tratamiento de indicaciones autoinmunes, inflamatorias, o de trasplante. Los antígenos diana y productos y candidatos clínicos que son relevantes para dichas enfermedades incluyen pero no están limitados a anticuerpos anti-integrina α4β7 tales como LDP-02, anticuerpos anti-integrina beta2, tales como LDP-01, anticuerpos anti-complemento (C5) tales como 5G1.1, anticuerpos anti-CD2 tales como BTI-322, MEDI-507, anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3, SMART anti-CD3, anticuerpos anti-CD4 tales como IDEC-151, MDX-CD4, OKT4A, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-CD14 tales como IC14, anticuerpos anti-CD18, anticuerpos anti-CD23 tales como IDEC 152, anticuerpos anti-CD25 tales como Zenapax, anticuerpos anti-CD40L tales como 5c8, Antova, IDEC-131, anticuerpos anti-CD64 tales como MDX-33, anticuerpos anti-CD80 tales como IDEC-114, anticuerpos anti-CD147 tales como ABX-CBL, anticuerpos anti-E-selectina tales como CDP850, anticuerpos anti-gpIIb/IIIa tales como ReoPro/Abcixima, anticuerpos anti-ICAM-3 tales como ICM3, anticuerpos anti-ICE tales como VX-740, anticuerpos anti-FcR1 tales como MDX-33, anticuerpos anti-

IgE tales como rhuMab-E25, anticuerpos anti-IL-4 tales como SB-240683, anticuerpos anti-IL-5 tales como SB-240563, SCH55700, anticuerpos anti-IL-8 tales como ABX-IL8, anticuerpos anti-interferón gamma, anticuerpos anti-TNF (TNF, TNFa, TNF $\alpha$ , TNF-alfa) tales como CDP571, CDP870, D2E7, Infliximab, MAK-195F, y anticuerpos anti-VLA-4 tales como Antegren.

- 5 Las variantes de Fc de la presente invención tales como aquellas con unión incrementada a FcRn pueden utilizarse en moléculas inhibitoras de TNF para proporcionar propiedades aumentadas. Las moléculas inhibitoras de TNF útiles incluyen cualquier molécula que inhiba la acción de TNF-alfa en un mamífero. Los ejemplos adecuados incluyen la fusión Fc Enbrel® (etanercept) y los anticuerpos Humira® (adalimumab) y Remicade® (infliximab). Los anticuerpos monoclonales (tales como Remicade y Humira) preparados por ingeniería usando las variantes de Fc de la presente invención para incrementar la unión a FcRn, pueden traducirse en mejor eficacia a través de una vida media incrementada.

En algunas realizaciones, se usan anticuerpos frente a enfermedades infecciosas. Los anticuerpos frente a células eucariotas incluyen anticuerpos dirigidos a células de levadura, incluyendo pero no limitado a *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *plasmodium falciparum*, y *Yarrowia lipolytica*.

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

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

Los anticuerpos producidos frente a antígenos procariotas también son útiles, incluyendo anticuerpos frente a bacterias adecuadas tales como procariotas patógenos y no patógenos incluyendo pero no limitado a *Bacillus*, incluyendo *Bacillus anthracis*; *Vibrio*, por ejemplo, *V. cholerae*; *Escherichia*, por ejemplo, *E.coli* Enterotoxigénica, *Shigella*, por ejemplo, *S.dysenteriae*; *Salmonella*, por ejemplo, *S. typhi*, *Mycobacterium* por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. leprae*; *Clostridium*, por ejemplo, *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. difficile*, *C.perfringens*; *Cornyebacterium*, por ejemplo, *C. diphtheriae*; *Streptococcus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*; *Staphylococcus*, por ejemplo, *S. aureus*; *Haemophilus*, por ejemplo, *H. influenzae*; *Neisseria*, por ejemplo, *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*; *Yersinia*, por ejemplo, *Y. lamblia*, *Y. pestis*, *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. aeruginosa*, *P. putida*; *Chlamydia*, por ejemplo, *C. trachomatis*; *Bordetella*, por ejemplo, *B. pertussis*; *Treponema*, por ejemplo, *T. palladium*; *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Brucella spp.*, *F. tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. pseudomallei*, *C. botulinum*, *Salmonella spp.*, *SEB V. toxina del cólera B*, *E. coli O157:H7*, *Listeria spp.*, *Trichosporon beigellii*, *Rhodotorula especies*, *Hansenula anomala*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Listeria sp.*, *Mycoplasma sp.* y semejantes.

En algunos aspectos, los anticuerpos están dirigidos frente a infecciones virales; estos virus incluyen, pero no están limitados a, incluyendo ortomixovirus, (por ejemplo, virus de influenza), paramixovirus (por ejemplo, virus sincitial respiratorio, virus de paperas, virus de sarampión), adenovirus, rinovirus, coronavirus, reovirus, togavirus (por ejemplo, virus de rubeola), parvovirus, poxvirus (por ejemplo, virus de viruela, virus vaccinia), enterovirus (por ejemplo, poliovirus, coxsackievirus), virus de hepatitis (incluyendo A, B y C), herpesvirus (por ejemplo, virus del herpes simple, virus varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr), rotavirus, virus Norwalk, hantavirus, arenavirus, rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia), retrovirus (incluyendo VIH, HTLV-I y -II), papovavirus (por ejemplo, papilomavirus), poliomavirus, y picornavirus, y semejantes.

#### Propiedades de Variantes de IgG Optimizadas

La presente solicitud también proporciona variantes de IgG que se optimizan para una variedad de propiedades terapéuticamente relevantes. Una variante de IgG que se prepara por ingeniería o se predice que presenta una o más propiedades optimizadas se refiere en la presente memoria como una "variante de IgG optimizada". Las propiedades más preferidas que pueden optimizarse incluyen pero no están limitadas a afinidad aumentada o reducida para FcRn y vida media *in vivo* incrementada o disminuida. Las realizaciones adecuadas incluyen anticuerpos que presentan afinidad de unión incrementada para FcRn a pH disminuido, tal como el pH asociado con endosomas, por ejemplo pH 6,0, mientras se mantiene la afinidad reducida a pH mayor, tal como 7,4., para permitir una captación incrementada en endosomas pero velocidades de liberación normales. De manera similar, estos anticuerpos con unión a FcRn modulada pueden tener opcionalmente otras propiedades deseables, tales como unión a Fc $\gamma$ R modulada, tal como se resalta en U.S.S.N.s U.S.S.N.s 11/174.287, 11/124.640, 10/822.231, 10/672.280, 10/379.392, y la solicitud de patente titulada IgG Immunoglobulin variants with optimized effector function presentada el 21 de octubre, 2005 que tiene el no. de solicitud 11/256.060. Esto es, las propiedades optimizadas también incluyen pero no están limitadas a afinidad aumentada o reducida para un Fc $\gamma$ R. En una realización opcional, las variantes de IgG se optimizan para poseer afinidad aumentada para un Fc $\gamma$ R activador humano, preferiblemente Fc $\gamma$ RIIIa además del perfil de unión a FcRn. En otra realización alternativa opcional más, las variantes de IgG se optimizan para poseer una afinidad reducida para el receptor inhibitor humano Fc $\gamma$ RIIb. Esto

es, realizaciones particulares abarcan el uso de anticuerpos que muestran una unión incrementada a FcRn, y unión incrementada a FcγRIIIa. Otras realizaciones utilizan el uso de anticuerpos que muestran unión incrementada para FcRn, y unión incrementada a FcγRIIIa. Estas realizaciones se anticipan para proporcionar polipéptidos IgG con propiedades terapéuticas aumentadas en seres humanos, por ejemplo función efectora aumentada y mayor potencia anti-cancerosa. En una realización alternativa, las variantes de IgG se optimizan para tener una afinidad incrementada o reducida para FcRn y afinidad incrementada o disminuida para un FcγR humano, incluyendo pero no limitado a FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIIb incluyendo sus variaciones alélicas. Estas realizaciones se anticipan para proporcionar polipéptidos IgG con propiedades terapéuticas aumentadas en seres humanos, por ejemplo vida media sérica incrementada y función efectora reducida. En otras realizaciones, las variantes de IgG proporcionan afinidad aumentada para FcRn y afinidad aumentada para uno o más FcγR, con afinidad reducida para uno o más FcγR adicionales. Por ejemplo, una variante de IgG puede tener unión aumentada para FcRn y FcγRIIIa, con unión reducida para FcγRIIb. Alternativamente, una variante de IgG puede tener unión reducida para FcRn y para FcγR. En otra realización, una variante de IgG puede tener afinidad reducida para FcRn y afinidad aumentada para FcγRIIb, con afinidad reducida para uno o más FcγR activadores. En otra realización más, una variante de IgG puede tener vida media sérica incrementada y funciones efectoras reducidas.

Las realizaciones preferidas comprenden la optimización de la unión a un FcRn y FcγR humano, sin embargo en realizaciones alternativas las variantes de IgG poseen afinidad aumentada o reducida para FcRn y FcγR de organismos no humanos, incluyendo pero no limitado a roedores y primates no humanos. Las variantes de IgG que se optimizan para unión a un FcRn no humano pueden encontrar uso en experimentación. Por ejemplo, los modelos de ratón están disponibles para una variedad de enfermedades que permiten el ensayo de propiedades tales como eficacia, toxicidad, y farmacocinética para un candidato a fármaco dado. Como se conoce en la técnica, las células cancerosas pueden injertarse o inyectarse en ratones para mimetizar un cáncer humano, un proceso referido como xenoinjerto. El ensayo de las variantes de IgG que comprenden variantes de IgG que se optimizan para FcRn puede proporcionar información valiosa respecto a las características de aclaramiento de la proteína, su mecanismo de aclaramiento, y semejantes. Las variantes de IgG también pueden optimizarse para funcionalidad incrementada y/o propiedades de disolución en forma aglicosilada. Los ligandos Fc incluyen pero no están limitados a FcRn, FcγRs, C1q, y proteínas A y G, y pueden ser de cualquier fuente incluyendo pero no limitado a ser humano, ratón, rata, conejo, o mono, preferiblemente ser humano. En una realización preferida alternativa, las variantes de IgG se optimizan para ser más estables y/o más solubles que la forma aglicosilada de la variante de IgG parental.

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

Preferiblemente, la especificidad de ligando Fc de la variante de IgG determinará su utilidad terapéutica. La utilidad de una variante de IgG dada para propósitos terapéuticos dependerá del epítipo o forma del antígeno diana y la enfermedad o indicación que se va a tratar. Para la mayor parte de las dianas e indicaciones, puede ser preferible una unión aumentada a FcRn ya que la unión aumentada a FcRn puede resultar en un incremento de la vida media sérica. Las vidas medias séricas mayores permiten una dosificación menos frecuente o dosificación menor del terapéutico. Esto es particularmente preferible cuando el agente terapéutico se proporciona en respuesta a una indicación que requiere administración repetida. Para algunas dianas e indicaciones, puede ser preferible una afinidad disminuida para FcRn. Esto puede ser particularmente preferible cuando se desea una variante de Fc con aclaramiento incrementado o vida media sérica disminuida, por ejemplo en polipéptidos Fc usados como agentes formadores de imágenes o radio-terapéuticos.

Pueden usarse variantes de IgG que comprenden variantes de IgG que proporcionan afinidad aumentada para FcRn con afinidad aumentada para FcγR activadores y/o reducida para FcγR inhibidores. Para algunas dianas e indicaciones, puede ser además beneficioso utilizar variantes de IgG que proporcionen selectividad diferencial para diferentes FcγR activadores; por ejemplo, en algunos casos puede desearse una unión aumentada a FcγRIIa y FcγRIIIa, pro no FcγRI, mientras en otros casos, puede preferirse unión aumentada sólo a FcγRIIa. Para determinadas dianas e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que alteran la unión a FcRn y aumentan las funciones efectoras tanto mediadas por FcγR como mediadas por complemento, mientras para otros casos puede ser ventajoso utilizar variantes de IgG que aumentan la unión a FcRn, o vida media sérica, y bien las funciones efectoras mediadas por FcγR o mediadas por complemento. Para algunas dianas o indicaciones de cáncer, puede ser ventajoso reducir o suprimir una o más funciones efectoras, por ejemplo, desactivando la unión a C1q, uno o más FcγR, FcRn, o uno o más ligandos de Fc. Para otras dianas e indicaciones, puede ser preferible utilizar variantes de IgG que proporcionan unión aumentada al FcγRIIb inhibidor, con nivel WT, reducido, o suprimida a FcγRs activadores. Esto puede ser particularmente útil, por ejemplo, cuando el objetivo de una variante de IgG es inhibir la inflamación o enfermedad auto-inmune, o modular el sistema inmune de alguna manera. Como las enfermedades auto-inmunes son generalmente duraderas y el tratamiento se proporciona en dosificación repetida, se prefiere particularmente su tratamiento con variantes de Fc con vida media incrementada de FcRn incrementado.

La modificación puede hacerse para mejorar la estabilidad, solubilidad, función, o uso clínico de la IgG. En una realización preferida, las variantes de IgG pueden incluir modificaciones para reducir la inmunogenicidad en los seres humanos. En una realización lo más preferida, la inmunogenicidad de una variante de IgG se reduce usando

un método descrito en USSN 11/004.590. En realizaciones alternativas, las variantes de IgG se humanizan (Clark, 2000, Immunol. Today 21:397-402).

5 Las variantes de IgG pueden incluir modificaciones que reducen la inmunogenicidad. Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia parental a proteínas MHC. Por ejemplo, podrían prepararse por ingeniería modificaciones de aminoácidos de manera que no hay o hay un número mínimo de epítopos inmunes que se predice que se unen, con alta afinidad, a cualesquiera alelos MHC prevalentes. En la técnica se conocen varios métodos para identificar epítopos de unión a MHC en secuencias de proteínas y pueden usarse para puntuar epítopos en una variante de IgG. Véase, por ejemplo, WO 98/52976; WO 02/079232; WO 00/3317; USSN 09/903.378; USSN 10/039.170; USSN 60/222.697; USSN 10/754.296; PCT WO 01/21823; y PCT WO 02/00165; Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: 942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561; WO 98/59244; WO 02/069232; WO 02/77187; Marshall et al., 1995, J. Immunol. 154: 5927-5933; y Hammer et al., 1994, J. Exp. Med. 180: 2353-2358. La información basada en secuencia puede usarse para determinar una puntuación de unión para una interacción dada péptido - MHC (véase, por ejemplo, Mallios, 1999, Bioinformatics 15: 432-439; Mallios, 2001, Bioinformatics 17: p942-948; Sturniolo et al., 1999, Nature Biotech. 17: 555-561).

#### *Variantes de IgG Preparadas por Ingeniería*

20 Las variantes de la presente invención pueden diseñarse por varios medios. Las variantes, como se describe en la presente memoria, pueden ser inserciones, deleciones, sustituciones, otras modificaciones, o combinaciones de éstas y otros cambios. Una realización particularmente nueva de la presente invención es el diseño de inserciones y deleciones que bien mejoran o reducen la unión de un polipéptido Fc a un ligando Fc. Como se describe en la presente memoria, pueden hacerse inserciones o deleciones que incrementan o disminuyen la afinidad del polipéptido Fc para FcRn. Las inserciones y deleciones pueden diseñarse por estrategias racionales o por estrategias que incluyen el uso de componentes aleatorios, tales como creación o cribado de bibliotecas aleatoria o semi-aleatoria. En una realización alternativa, se describen sustituciones que incrementan o disminuyen la afinidad del polipéptido Fc para FcRn.

#### *Modificaciones del Núcleo: Inserciones y deleciones*

30 Los polipéptidos Fc variantes pueden crearse sustituyendo un aminoácido variante en lugar del aminoácido parental en una posición en el polipéptido Fc. Mediante la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos variantes en el polipéptido Fc, se alteran las cadenas laterales en esas posiciones. Las sustituciones más útiles modifican las propiedades de Fc alterando las cadenas laterales de Fc. Las cadenas laterales sustituidas pueden interactuar directamente o indirectamente con una pareja de unión de Fc que está asociada con una función o propiedad de Fc. La al menos una sustitución altera la estructura covalente de una o más cadenas laterales del polipéptido Fc parental.

35 Alternativamente, pueden crearse polipéptidos Fc variantes que cambian la estructura covalente del núcleo del polipéptido Fc parental. Los átomos de núcleo en proteínas son el nitrógeno peptídico, al carbono alfa, el carbonilo o el carbono peptídico y el oxígeno carbonilo. El cambio de la estructura covalente del núcleo proporciona métodos adicionales de alterar las propiedades de los polipéptidos Fc. La estructura covalente del núcleo de Fc puede alterarse por la adición de átomos en el núcleo, por ejemplo, insertando uno o más aminoácidos, o la sustracción de átomos del núcleo, por ejemplo, deleccionando uno o más aminoácidos. La estructura covalente del núcleo también puede alterarse cambiando átomos individuales del núcleo por otros átomos (Deechongkit et al., J Am Chem Soc. 2004.- 126(51):16762-71). Como se conoce en la técnica y se ilustra en la presente memoria, pueden hacerse inserciones o deleciones de aminoácidos en polipéptidos Fc insertando o deleccionando los nucleótidos correspondientes en el ADN que codifica el polipéptido Fc. Alternativamente, como se conoce en la técnica, pueden hacerse inserciones o deleciones de aminoácidos durante la síntesis de los polipéptidos Fc.

45 El diseño de inserciones o deleciones de aminoácidos que alteran la interacción del polipéptido Fc con una o más parejas de unión (por ejemplo, Fc $\gamma$ R, FcRn, C1q) puede hacerse considerando la estructura del complejo del polipéptido Fc y su pareja de unión. En una realización menos preferida, el diseño puede hacerse considerando la estructura del polipéptido Fc y la información acerca de la región Fc implicada en la unión a la pareja de unión. Esta información puede obtenerse por experimentos de mutagénesis, experimentos de exposición en fago, comparaciones de homología, modelado informático u otros medios.

55 Las posiciones preferidas en la secuencia de aminoácidos para inserciones o deleciones que afectan las interacciones de unión de Fc, pero no afectan la estructura global, estabilidad, expresión o uso del polipéptido Fc, son en bucles que están implicados en las interacciones Fc/pareja de unión de Fc. Para alterar la unión de FcRn al polipéptido Fc, las posiciones 244-257, 279-284, 307-317, 383-390, y 428-435 son localizaciones preferidas de bucle para inserciones o deleciones (numeración del índice EU de Kabat et al., Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379-383; Martin et al., 2001, Mol Cell 7:867-877). Para alterar la unión del receptor Fc $\gamma$  al polipéptido Fc, las posiciones 229-239, 266-273, 294-299, y 324-331 son localizaciones preferidas de bucle para inserciones o deleciones (numeración del índice EU de Kabat et al., PDB código 1 E4K.pdb Sondermann et al. Nature. 2000 406:267). Los bucles son regiones del polipéptido no implicadas en la estructura de hélice alfa o lámina beta. Las

posiciones de bucle son posiciones que no están ni en estructura hélice alfa ni lámina beta (van Holde, Johnson y Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, Nueva Jersey 1998, Capítulo 1 p2-67). Las posiciones de bucle se prefieren porque los átomos del núcleo son típicamente más flexibles y están menos probablemente implicados en enlaces de hidrógeno comparado con los átomos de núcleo de hélices alfa y láminas beta. Por lo tanto, el alargamiento o acortamiento de un bucle debido a una inserción o deleción de uno o más aminoácidos es menos probable que de lugar a cambios grandes, disruptivos en el polipéptido Fc, incluyendo estabilidad, expresión u otros problemas.

Pueden usarse inserciones y deleciones para alterar la longitud del polipéptido. Por ejemplo, en las regiones de bucle, la alteración de la longitud del bucle resulta en una flexibilidad y entropía conformacional alteradas del bucle. Las inserciones en el bucle incrementarán generalmente la entropía conformacional del bucle, que puede definirse como la constante de Boltzman multiplicada por el logaritmo natural del número de posibles conformaciones (van Holde, Johnson y Ho. Principles of Physical Biochemistry. Prentice Hall, Nueva Jersey 1998, pp78). Mediante la inserción de al menos un aminoácidos en un polipéptido, se incrementa el número total de conformaciones disponibles en el polipéptido. Estas conformaciones adicionales pueden ser beneficiosas para formar interacciones Fc/pareja de unión de Fc favorables porque el polipéptido Fc puede usar una de las conformaciones adicionales en la unión a la proteína de unión a Fc. En este caso, la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes. Si las conformaciones adicionales no se usan en la interfase de unión, la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles, porque las conformaciones adicionales competirían con la conformación competente para la unión. De manera similar, la deleción de un segmento de polipéptido también puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes o más débiles. Si la deleción de un segmento, que reduce el número posible de conformaciones de núcleo, elimina la conformación competente para la unión, la deleción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles. Si la deleción no elimina la conformación competente para la unión, la deleción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes porque la deleción puede eliminar conformaciones que compiten con la conformación competente para la unión.

Pueden usarse inserciones y deleciones para alterar las posiciones y orientaciones de los aminoácidos en el polipéptido Fc. Como las inserciones y deleciones causan un cambio en la estructura covalente del núcleo, causan necesariamente un cambio en las posiciones de los átomos del núcleo. La Figura 7 compara las posiciones en el núcleo en algunos segmentos de bucle, marcadas L1 a L4, en tres núcleos diferentes. La estructura de núcleo de referencia contiene cuatro segmentos de bucle, mientras el núcleo de deleción carece del segmento L1 y el segmento de inserción comprende un segmento adicional antes, es decir, N-terminal respecto a, el segmento L1. Las deleciones e inserciones causan el cambio mayor en la estructura del núcleo cerca del sitio de la inserción o deleción. Mediante la deleción de un segmento cerca del extremo N-terminal del bucle, por ejemplo, segmento L1, el bucle se acorta y los segmentos remanentes cambian su posición más cerca del extremo N del bucle. Esto tiene el efecto de mover el segmento L2 hacia la localización anterior del segmento L1 y hacia el extremo N del bucle. Este cambio de posición del segmento L2 hacia el segmento L1 puede reforzar la unión del complejo Fc/pareja de unión de Fc y se prefiere cuando hay una información anterior que sugiere que el aminoácido o aminoácidos localizados en L2 establecen interacciones favorables con la pareja de unión de Fc, cuando están localizados en L1. Por ejemplo, si L2 contiene alanina y tirosina y la sustitución de dos aminoácidos en L1 para alanina y tirosina da lugar previamente a una variante de Fc con unión incrementada, la deleción de L1 puede crear una variante de Fc con afinidad incrementada para la pareja de unión de Fc.

De manera similar, una inserción de un segmento de polipéptido en un polipéptido Fc en el lado N-terminal de un bucle causa que las posiciones de los segmentos del bucle cambien hacia el lado C-terminal del bucle. En la Figura 7, una inserción de uno o más aminoácidos antes, es decir, N-terminal respecto a, el segmento L1 altera la conformación del bucle incluyendo un desplazamiento del segmento L1 hacia el extremo C-terminal del bucle. Este tipo de inserción se prefiere cuando se sabe que los aminoácidos localizados en el segmento L1 establecen interacciones favorables cuando están localizados en las posiciones L2, ya que la inserción puede dar lugar a interacciones Fc/pareja de unión de Fc más fuertes. Si se desean interacciones Fc/pareja de unión de Fc más débiles, la inserción puede usarse para cambiar aminoácidos no favorables a una nueva posición. Los segmentos insertados, delecionados y de referencia (L1 a L4 en la Figura 7) pueden ser uno o más de un aminoácido en el polipéptido Fc.

Alternativamente, pueden usarse inserciones o deleciones en el extremo C-terminal de bucles de una manera análoga a las inserciones o deleciones en el extremo N-terminal de bucles. Las inserciones en el extremo C del bucle pueden dar lugar a un movimiento de las posiciones N-terminales de la inserción hacia el extremo N del bucle. Las deleciones en el extremo C del bucle pueden dar lugar a un movimiento de las posiciones N-terminales de la deleción hacia el extremo C del bucle. La elección de usar una inserción o deleción en el extremo N-terminal o C-terminal del bucle se basa en los aminoácidos localizados en el bucle, el deseo de afinidad incrementada o disminuida de Fc/pareja de unión de Fc, y el cambio posicional deseado.

Pueden usarse inserciones o deleciones en cualquier región de un polipéptido Fc, incluyendo los bucles, las regiones de hélice alfa, y lámina beta. Las localizaciones preferidas para inserciones y deleciones incluyen las regiones de bucle, que son aquellas que no son regiones de hélice alfa o lámina beta. Se prefieren los bucles porque aceptan generalmente alteraciones en el núcleo mejor que las hélices alfa o láminas beta. Las localizaciones

particularmente preferidas para inserciones o deleciones que resultan en interacciones proteína/proteína más fuertes son en los extremos N-terminal o C-terminal de un bucle. Si las cadenas laterales del bucle están implicadas en las interacciones Fc/pareja de unión de Fc, las inserciones o deleción en los extremos dan lugar menos probablemente a cambios muy perjudiciales en las interacciones de unión. Las deleciones en el centro exacto del bucle eliminan más probablemente residuos importantes en la interfase Fc/pareja de unión de Fc y las inserciones en el centro exacto del bucle crean más probablemente interacciones desfavorables en la interfase Fc/pareja de unión de Fc. El número de residuos delecionados o insertados puede determinarse por el tamaño del cambio en el núcleo deseado prefiriéndose inserciones o deleciones de 15 o menos residuos, prefiriéndose más inserciones o deleciones de 10 o menos residuos, y siendo lo más preferido inserciones o deleciones de 5 o menos residuos.

Una vez se diseña la posición y tamaño de una variante de deleción de Fc, la secuencia completa de polipéptido se determina completamente y el polipéptido puede construirse por métodos conocidos en la técnica.

Las variantes de inserción de Fc, sin embargo, tienen la etapa adicional de diseñar la secuencia de al menos un aminoácido que se va a insertar. Las inserciones de residuos polares, incluyendo Ser, Thr, Asn, Gln, Ala, Gly, His, se prefieren en posiciones que se espera que van a estar expuestas en el polipéptido Fc. Los aminoácidos más pequeños, incluyendo Ser, Thr, y Ala, se prefieren particularmente ya que el tamaño pequeño interferirá estéricamente menos probablemente con las interacciones Fc/pareja de unión de Fc. Ser y Thr también tienen la capacidad de enlace de hidrogeno con átomos en la pareja de unión de Fc.

Las inserciones también tienen la flexibilidad añadida de que el polipéptido insertado puede diseñarse para establecer interacciones favorables con la pareja de unión de Fc como se desearía cuando se desea una unión Fc/pareja de unión de Fc más fuerte. La longitud de la inserción del núcleo puede determinarse modelando el núcleo variante con una secuencia genérica simple que se va a insertar. Por ejemplo, pueden construirse y modelarse inserciones de poliserina, poliglicina o polialanina de diferentes longitudes. El modelado puede hacerse por una variedad de métodos, incluyendo modelado de homología basado en estructuras tridimensionales conocidas de homólogos que comprenden la inserción, y por modelado informático incluyendo MODELLER (M.A. Marti-Renom et al. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29, 291-325, 2000) y ROSETTA (Kuhlman et al. (2003). Science 302, 1364-8). Típicamente, se generan inicialmente varias conformaciones de núcleo y la estructura final de núcleo puede determinarse después de establecer las identidades de la cadena lateral. Las cadenas laterales pueden diseñarse por algoritmos PDA® (US 6.188.965; 6.269.312;6.403.312; 6.801.861; 6.804.611;6.792.356. 6.950.754, y USSN 09/782.004; 09/927.790; 10/101.499; 10/666.307; 10/666311; 10/218.102).

Las inserciones y deleciones pueden hacerse para alterar la unión de polipéptidos Fc a Fc $\gamma$ R de una manera análoga al método descrito para alterar las propiedades de unión de FcRn. Los dominios Fc se unen a Fc $\gamma$ R en la posición indicada en la Figura 1. Las estructuras del complejo Fc/Fc $\gamma$ R, incluyendo PDB códigos 1T89 y 1IIS (Radaev S et al. J. Biol. Chem. v276, p.16469-16477), demuestran los residuos que interaccionan y los bucles entre las dos estructuras. Los resultados de mutagénesis tales como los encontrados en US11/124620 y US6737056) tienen todos utilidad para determinar los cambios apropiados del posicionamiento del núcleo.

Pueden diseñarse inserciones y deleciones en cualquier polipéptido además de los polipéptidos Fc por los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, pueden diseñarse inserciones o deleciones en el miembro de la superfamilia TNF, APRIL, con la ayuda de su estructura tri-dimensional (PDB código 1XU1.pdb, Hymowitz, et al. (2005) J. Biol. Chem. 280:7218). Pueden diseñarse inserciones o deleciones para incrementar la unión de APRIL a su receptor, TACI. Los residuos de bucle preferidos como sitios de inserción o deleción son los residuos Ser118-Val124, Asp164-Phe167, Pro192-Ala198, Pro221-Lys226. Estos bucles interaccionan con TACI en el complejo APRIL/TACI y median la unión.

#### *Polipéptidos que incorporan variantes*

Las variantes de IgG pueden basarse en secuencias de IgG humana, y así se usan secuencias de IgG humana como las secuencias "base" frente a las que se comparan otras secuencias, incluyendo pero no limitado a secuencias de otros organismos, por ejemplo secuencias de roedor y primate. Las variantes de IgG también pueden comprender secuencias de otras clases de inmunoglobulina tales como IgA, IgE, IgD, IgM, y semejantes. Se contempla que, aunque las variantes de IgG se preparan por ingeniería en el contexto de una IgG parental, las variantes pueden prepararse por ingeniería en o "transferirse" en el contexto de otra, segunda IgG parental. Esto se hace determinando los residuos "equivalentes" o "correspondientes" y sustituciones entre la primera y segunda IgG, típicamente basado en homología de secuencia o estructural entre las secuencias de las IgG. Con el fin de establecer homología, la secuencia de aminoácidos de una primera IgG mostrada en la presente memoria se compara directamente con la secuencia de una segunda IgG. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineamiento para homología conocidos en la técnica (por ejemplo, usando residuos conservados como entre especies), permitiendo inserciones y deleciones necesarias con el fin de mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de residuos conservados mediante deleción e inserción arbitraria), se definen los residuos equivalentes a aminoácidos particulares en la secuencia primaria de la primera variante de IgG. El alineamiento de residuos conservados debería conservar preferiblemente el 100% de dichos residuos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75% o tan poco como 50% de los residuos conservados también es adecuado para definir residuos equivalentes. Los residuos equivalentes también pueden definirse determinando la homología

estructural entre una primera y una segunda IgG esto a nivel de estructura terciaria para IgG cuyas estructuras se han determinado. En este caso, los residuos equivalentes se definen como aquellos para los que las coordenadas atómicas de dos o más de los átomos de la cadena principal de un residuo de aminoácidos particular del parental o precursor (N en N, CA en CA, C en C y O en O) están en 0,13 nm y preferiblemente 0,1 nm después del alineamiento. El alineamiento se consigue después de que se haya orientado y posicionado el mejor modelo para proporcionar la superposición máxima de coordenadas atómicas de átomos de proteína distintos de hidrógeno de las proteínas. Independientemente de cómo se determinan los residuos equivalentes o correspondientes, e independientemente de la identidad de la IgG parental en la que se hacen las IgG, lo que se quiere transmitir es que las variantes de IgG descubiertas puedan prepararse por ingeniería en una segunda IgG parental que tiene una homología de secuencia o estructural significativa con la variante de IgG. Así, por ejemplo, si se genera un anticuerpo variante en el que el anticuerpo parental es una IgG1 humana, usando los métodos descritos anteriormente u otros métodos para determinar residuos equivalentes, el anticuerpo variante puede prepararse por ingeniería en otro anticuerpo IgG1 parental que se une a un antígeno diferente, un anticuerpo IgG2 parental humano, un anticuerpo IgA parental humano, un anticuerpo IgG2a o IgG2b parental de ratón, y semejantes. De nuevo, como se ha descrito anteriormente, el contexto de la variante de IgG parental no afecta la capacidad de transferir las variantes de IgG a otras IgG parentales.

Se proporcionan métodos para preparar por ingeniería, producir, y cribar variantes de IgG. Los métodos descritos no se pretende que se restrinjan a ninguna aplicación o teoría particular de operación. En lugar de esto, los métodos proporcionados se pretende que ilustren generalmente que una o más variantes de IgG pueden prepararse por ingeniería, producirse, y cribarse experimentalmente para obtener variantes de IgG con función efectora optimizada. Se describen una variedad de métodos para diseñar, producir, y ensayar variantes de anticuerpo y proteína en USSN 10/754,296, y USSN 10/672.280.

Puede usarse una variedad de métodos de preparación por ingeniería de proteínas para diseñar variantes de IgG con función efectora optimizada. En una realización, puede usarse un método de preparación por ingeniería basado en estructura, en el que la información estructural disponible se usa para guiar las sustituciones, inserciones o deleciones. En una realización preferida, puede usarse un método de cribado computacional, en el que las sustituciones se diseñan tomando como base su aptitud energética en cálculos computacionales. Véase, por ejemplo USSN 10/754.296 y USSN 10/672,280, y las referencias citadas en ellas.

Un alineamiento de secuencias puede usarse para guiar las sustituciones en las posiciones identificadas. Un experto en la técnica apreciará que el uso de información de secuencia puede frenar la introducción de sustituciones que son potencialmente perjudiciales para la estructura de la proteína. La fuente de secuencias puede variar ampliamente, e incluye una o más de las bases de datos conocidas, incluyendo pero no limitado a a base de datos Kabat (Northwestern University); Johnson y Wu, 2001, *Nucleic Acids Res.* 29:205-206; Johnson y Wu, 2000, *Nucleic Acids Res.* 28:214-218), la base de datos IMGT (IMGT, the international ImMunoGeneTics information system®; Lefranc et al., 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:209-212; Ruiz et al., 2000 *Nucleic Acids Res.* 28:219-221; Lefranc et al., 2001, *Nucleic Acids Res.* 29:207-209; Lefranc et al., 2003, *Nucleic Acids Res.* 31:307-310), y VBASE. La información de la secuencia de anticuerpo puede obtenerse, compilarse, y/o generarse a partir de alineamientos de secuencia de secuencias de línea germinal o secuencias de anticuerpos naturales de cualquier organismo, incluyendo pero no limitado a mamíferos. Un experto en la técnica apreciará que el uso de secuencias que son humanas o sustancialmente humanas puede tener además la ventaja de ser menos inmunogénicas cuando se administran a un ser humano. Otras bases de datos que son bases de datos más generales de ácidos nucleicos o proteínas, es decir, no particulares para anticuerpos, incluyen pero no están limitadas a SwissProt, GenBank Entrez, y EMBL Nucleotide Sequence Database. Las secuencias alineadas pueden incluir secuencias VH, VL, CH, y/o CL. Existen numerosos programas de alineamiento basados en secuencia y métodos conocidos en la técnica, y todos éstos encuentran uso en la generación de alineamientos de secuencia.

Alternativamente, pueden usarse métodos de mutagénesis aleatoria o semi-aleatoria para hacer modificaciones de aminoácidos en las posiciones deseadas. En estos casos, las posiciones se eligen aleatoriamente, o los cambios de aminoácidos se hacen usando reglas simplistas. Por ejemplo, todos los residuos pueden mutarse a alanina, referido como escaneo de alanina. Dichos métodos pueden acoplarse con estrategias de ingeniería más sofisticadas que emplean métodos de selección para cribar niveles más altos de diversidad de secuencia. Como es muy conocido en la técnica, hay una variedad de tecnologías de selección que pueden usarse para dichas estrategias, incluyendo, por ejemplo, tecnologías de exposición tales como exposición en fago, exposición en ribosomas, exposición en la superficie celular, y semejantes, como se describe más adelante.

Los métodos para la producción y cribado de variantes de IgG son muy conocidos en la técnica. Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación, y cribado de anticuerpos se describen en *Antibody Engineering*, editado por Duebel y Kontermann, Springer-Verlag, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, *Curr Opin Chem Biol* 5:683-689; Maynard y Georgiou, 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2:339-76. Véanse también los métodos descritos en USSN 10/754.296; USSN 10/672.280; y USSN 10/822.231; y 11/124.620. Las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 8. Alternativamente, las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 9. Además, alternativamente, las variantes preferidas de la presente invención incluyen las encontradas en la Figura 10. Estas variantes han mostrado una unión incrementada al receptor de Fc, FcRn, como se ilustra en los ejemplos.

### Preparación de Variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, las secuencias de variantes de IgG se usan para crear ácidos nucleicos que codifican las secuencias miembro, y pueden clonarse, expresarse y ensayarse en células huésped, si se desea. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos muy conocidos, y una variedad de métodos que pueden encontrar uso se describen en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3a Ed. (Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de IgG pueden incorporarse en un vector de expresión con el fin de expresar la proteína. Los vectores de expresión incluyen típicamente una proteína unida de manera operativa, esto es, posicionada en una relación funcional, con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualesquiera parejas de fusión, y/o elementos adicionales. Las variantes de IgG pueden producirse cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las variantes de IgG, bajo las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Puede usarse una amplia variedad de células huésped apropiadas, incluyendo pero no limitado a células de mamífero, bacterias, células de insecto, y levaduras. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso se describen en el catálogo de líneas celulares de ATCC, disponible en la American Type Culture Collection. Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en células huésped son muy conocidos en la técnica, y variarán con la célula huésped usada.

En una realización preferida, las variantes de IgG se purifican o aíslan después de la expresión. Los anticuerpos pueden aislarse o purificarse de varias formas conocidas para los expertos en la técnica. Los métodos estándar de purificación incluyen técnicas cromatográficas, electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, diálisis, concentración, y técnicas de cromatofluorecencia. Como es muy conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se unen a anticuerpos, por ejemplo las proteínas bacterianas A, G, y L, y estas proteínas pueden encontrar uso en la purificación. Frecuentemente, la purificación puede permitirse por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, las proteínas pueden purificarse usando resina de glutatión si se emplea una fusión con GST, cromatografía de afinidad de Ni<sup>2+</sup> si se emplea una etiqueta His, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se usa una etiqueta flag. Para las directrices generales sobre técnicas de purificación adecuadas, véase Antibody Purification: Principles and Practice, 3a Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994.

### Cribado de Variantes de IgG

Las variantes de Fc pueden cribarse usando una variedad de métodos, incluyendo pero no limitado a aquellos que usan ensayos *in vitro*, *in vivo* y ensayos basados en células, y tecnologías de selección. Puede utilizarse tecnologías de cribado automatizadas y de alto rendimiento en los procedimientos de cribado. El cribado puede emplear el uso de una pareja de fusión o marcador, por ejemplo un marcador inmune, marcador isotópico, o marcador que es una molécula pequeña tal como un agente fluorescente o colorimétrico.

En una realización preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las variantes de Fc se criban en un ensayo *in vitro*. En una realización preferida, la proteína se criba para funcionalidad, por ejemplo su capacidad de catalizar una reacción o su afinidad de unión a su diana.

Como se conoce en la técnica, los subconjuntos de métodos de cribado son aquellos que seleccionan miembros favorables de una biblioteca. Los métodos se refieren en la presente memoria como "métodos de selección", y estos métodos encuentran uso en la presente invención para cribar variantes de Fc. Cuando se criban bibliotecas de proteínas usando un método de selección, sólo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, esto es que cumplen algunos criterios de selección, se propagan, aíslan, y/o observan. En la técnica se conoce una variedad de métodos de selección que pueden encontrar uso en la presente invención para el cribado de bibliotecas de proteínas. Otros métodos de selección que pueden encontrar uso en la presente invención incluyen métodos que no se basan en la exposición, tales como métodos *in vivo*. Un subconjunto de métodos de selección referidos como métodos de "evolución dirigida" son aquellos que incluyen el acoplamiento o reproducción de secuencias favorables durante la selección, algunas veces con la incorporación de nuevas mutaciones.

En una realización preferida, las variantes de Fc se criban usando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para dichos ensayos, las proteínas purificadas o no purificadas se añaden típicamente exógenamente de manera que las células se exponen a variantes individuales o conjuntos de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos se basan típicamente, pero no siempre, en la función del polipéptido Fc; esto es, la capacidad del polipéptido Fc de unirse a su diana y mediar algún evento bioquímico, por ejemplo función efectora, inhibición de la unión ligando/receptor, apoptosis, y semejantes. Dichos ensayos implican frecuentemente monitorizar la respuesta de células a la IgG, por ejemplo supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular, o activación transcripcional tal como expresión celular de un gen natural o un gen informador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de variantes de Fc para incitar ADCC, ADCP, o CDC. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, estos es además de las células diana, por ejemplo complemento sérico, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, y semejantes. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferiblemente seres humanos, ratones, rata, conejo, y mono. Los anticuerpos pueden causar apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan la diana, o pueden mediar el ataque a células diana por células inmunes que se han añadido al

ensayo. Los métodos para monitorizar la muerte o viabilidad celular son conocidos en la técnica, e incluyen el uso de agentes de tinción, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos, y radiactivos. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en ensayos basados en células. Alternativamente, los cribados basados en células se llevan a cabo usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes. Esto es, las variantes de Fc no se añaden exógenamente a las células.

Las propiedades biológicas de las variantes de IgG pueden caracterizarse en experimentos en células, tejidos, y organismos completos. Como se conoce en la técnica, los fármacos se ensayan frecuentemente en animales, incluyendo pero no limitado a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos, y monos, con el fin de medir la eficacia del fármaco para el tratamiento frente a una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad, y otras propiedades de un fármaco. Los animales pueden referirse como modelos de enfermedad. Los terapéuticos se ensayan frecuentemente en ratones, incluyendo pero no limitado a ratones desnudos, ratones SCID, ratones con xenoinjerto, y ratones transgénicos (incluyendo con activaciones e inactivaciones génicas). Dicha experimentación puede proporcionar datos con significado para la determinación del potencial de la proteína que se va a usar como un terapéutico. Para el ensayo puede usarse cualquier organismo, preferiblemente mamíferos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los seres humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y así pueden usarse para ensayar la eficacia, toxicidad, farmacocinética, u otra propiedad de las IgG. Los ensayos en seres humanos se requieren finalmente para la aprobación como fármacos, y así por supuesto se contemplan estos experimentos. Así, las IgG pueden ensayarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, inmunogenicidad, farmacocinética, y/o otras propiedades clínicas.

#### Métodos para Usar las Variantes de IgG

Las variantes de IgG pueden encontrar uso en un amplio rango de productos. En una realización, la variante de IgG es un reactivo terapéutico, de diagnóstico, o de investigación, preferiblemente un terapéutico. La variante de IgG puede encontrar uso en una composición de anticuerpo que es monoclonal o policlonal. En una realización preferida, las variantes de IgG se usan para matar células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo células cancerosas. En una realización alternativa, las variantes de IgG se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo para antagonizar una citoquina o receptor de citoquina. En una realización alternativa preferida, las variantes de IgG se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana y matar las células diana que portan el antígeno diana.

Las variantes de IgG pueden usarse para varios propósitos terapéuticos. En una realización preferida, un anticuerpo que comprende la variante de IgG se administra a un paciente para tratar un trastorno relacionado con anticuerpos. Un "paciente" para los propósitos incluye seres humanos y otros animales, preferiblemente mamíferos y lo más preferiblemente seres humanos. Por "trastorno relacionado con anticuerpos" o "trastorno que responde a anticuerpos" o "afección" o "enfermedad" en la presente memoria se quiere decir un trastorno que puede mejorarse por la administración de una composición farmacéutica que comprende una variante de IgG. Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen pero no están limitados a enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas, y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. Por "cáncer" y "canceroso" en la presente memoria se hace referencia a o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen pero no están limitados a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia y malignidades linfoides.

En una realización, una variante de IgG es el único agente terapéuticamente activo administrado a un paciente. Alternativamente, la variante de IgG se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, incluyendo pero no limitado a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes anti-angiogénicos, cardioprotectores, u otros agentes terapéuticos. Las variantes de IgG pueden administrarse concomitantemente con uno o más de otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, una variante de IgG puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, terapia de radiación, o tanto quimioterapia como terapia de radiación. En una realización, la variante de IgG puede administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos, que pueden o no ser una variante de IgG. De acuerdo con otra realización, la variante de IgG y una o más de otras terapias anti-cancerosas se emplean para tratar células cancerosas *ex vivo*. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* pueda ser útil en el trasplante de médula ósea y, particularmente, trasplante de médula ósea autólogo. Por supuesto se contempla que las variantes de IgG pueden emplearse en combinación con aún otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.

Una variedad de otros agentes terapéuticos puede encontrar uso para administración con las variantes de IgG. En una realización, la IgG se administra con un agente anti-angiogénico. Por "agente anti-angiogénico" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir un compuesto que bloquea, o interfiere en algún grado con, el desarrollo de vasos sanguíneos. El factor anti-angiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, fusión Fc, o citoquina, que se une a un factor de crecimiento o receptor de factor de crecimiento implicado en promover la angiogénesis. El factor anti-angiogénico preferido en la presente memoria es un anticuerpo que se une al Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF). En una realización alternativa, la IgG se administra con un agente terapéutico que induce o aumenta la respuesta inmune adaptativa, por ejemplo un

anticuerpo que tiene como diana CTLA-4. En una realización alternativa, la IgG se administra con un inhibidor de tirosina quinasa. Por "inhibidor de tirosina quinasa" tal y como se usa en la presente memoria se quiere decir una molécula que inhibe en algún grado la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. En una realización alternativa, las variantes de IgG se administran con una citoquina.

- 5 Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan una variante de IgG y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de las variantes de IgG se preparan para almacenamiento mezclando la IgG que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16a edición, Osol, A. Ed., 1980,), en la forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Las formulaciones que se van a usar para administración *in vivo* son preferiblemente estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos. Las variantes de IgG y otros agentes terapéuticamente activos descritos en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas, y/o incluidos en microcápsulas.

- 15 La concentración de la variante de IgG terapéuticamente activa en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100% en peso. En una realización preferida, la concentración de la IgG está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Con el fin de tratar a un paciente, puede administrarse una dosis terapéuticamente efectiva de la variante de IgG. Por "dosis terapéuticamente efectiva" en la presente memoria se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será discernible por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,01, 0,1, 1,0, 10, ó 50 mg/kg de peso corporal, prefiriéndose 1 a 10mg/kg. Como se conoce en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para degradación de proteína, administración sistémica frente a localizada, y velocidad de nueva síntesis de proteasa, así como la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción de fármacos y la gravedad de la afección, y será discernible con experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

- 25 La administración de la composición farmacéutica que comprende una variante de IgG, preferiblemente en la forma de una disolución acuosa estéril, puede hacerse de varias maneras, incluyendo, pero no limitado a, oralmente, subcutáneamente, intravenosamente, parenteralmente, intranasalmente, intraóticamente, intraocularmente, rectalmente, vaginalmente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitonealmente, intramuscularmente, intrapulmonarmente (por ejemplo, tecnología inhalable AERx® disponible comercialmente en Aradigm, o sistema de administración pulmonar Inhance® disponible comercialmente en Nektar Therapeutics, etc.). El terapéutico descrito en la presente memoria puede administrarse con otros terapéuticos concomitantemente, es decir, los terapéuticos descritos en la presente memoria pueden co-administrarse con otras terapias o terapéuticos, incluyendo por ejemplo, moléculas pequeñas, otros biológicos, terapia de radiación, cirugía, etc.

## EJEMPLOS

- 35 A continuación se proporcionan ejemplos para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no se pretende que restrinjan la presente invención a ninguna aplicación o teoría particular de operación. Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es según el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Los expertos en la técnica de anticuerpos apreciarán que esta convención consiste en numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a posiciones conservadas en familias de inmunoglobulinas. De acuerdo con esto, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada según se definen por el índice EU no corresponderán necesariamente a su secuencia secuencial.

### EJEMPLO 1: Construcción de ADN, expresión, y purificación de variantes de Fc

- 45 Se construyeron variantes de Fc usando el dominio Fc de IgG1 humana y el dominio variable de trastuzumab (Herceptin®, Genentech). Los polipéptidos Fc eran parte de Alemtuzumab, un anticuerpo anti-HER2 o AC10. Alemtuzumab (Campath®, un marca comercial registrada de Millenium) es un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B (Hale et al., 1990, Tissue Antigens 35:118-127,). Trastuzumab (Herceptin®, un marca comercial registrada de Genentech) es un anticuerpo anti-HER2/neu para el tratamiento de cáncer de mama metastásico. Las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo anti-HER2 se muestran en la Figura 22. AC10 es un anticuerpo monoclonal anti-CD30. La región variable de Herceptin se ensambló usando PCR recursiva. La región variable se clonó con IgG1 humana en el vector pcDNA3.1/Zeo(+) (Invitrogen), mostrado en la Figura 11. Se propagaron plásmidos en células de E. coli One Shot TOP10 (Invitrogen) y se purificó usando el Hi-Speed Plasmid Maxi Kit (Qiagen). Los plásmidos se secuenciaron para verificar la presencia de los insertos clonados.

Se hizo mutagénesis dirigida a sitio usando el método Quikchange™ (Stratagene). Los plásmidos que contenían las sustituciones, inserciones, y deleciones deseadas se propagaron en células de E. coli One Shot TOP10 (Invitrogen) y se purificaron usando el Hi-Speed Plasmid Maxi Kit (Qiagen). El ADN se secuenció para confirmar la fidelidad de las secuencias.

Los plásmidos que contenían el gen de la cadena pesada (VH-Cy1-Cy2-Cy3) (tipo salvaje o variantes) se co-transfectaron con plásmido que contenía el gen de la cadena ligera (VL-C $\kappa$ ) en células 293T. Se recogieron los medos 5 días después de la transfección, y los anticuerpos se purificaron del sobrenadante usando cromatografía de afinidad con proteína A (Pierce). Las características de unión a la proteína A de algunos Fc modificados se muestran en la Figura 26. Las concentraciones de anticuerpo se determinaron por el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce).

#### EJEMPLO 2: Medidas de la afinidad de unión

La unión de los polipéptidos Fc a ligandos Fc se ensayó con medidas de resonancia de plasmón superficial. Las medidas de resonancia de plasmón superficial (SPR) se llevaron a cabo usando un instrumento BIAcore 3000 (BIAcore AB). El anticuerpo de tipo salvaje o variante se capturó usando proteína L inmovilizada (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), y se midió la unión al analito receptor. La proteína L se acopló covalentemente a un chip sensor CM5 a una concentración de 1  $\mu$ M en 10 mM acetato de sodio, pH 4,5 en un chip sensor CM5 usando N-hidroxisuccinimida/N-etil-N'-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (NHS/EDC) a una velocidad de flujo de 5  $\mu$ l/min. La celda de flujo 1 de cada chip sensor se utilizó como simulación con NHS/EDC como un control negativo de unión. El tampón de corrida fue 0,01 M HEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% v/v Tensioactivo P20 (HBS-EP, Biacore, Uppsala, Suecia), y el tampón de regeneración del chip fue 10 mM glicina-HCl pH 1,5. Se unió 125 nM anticuerpo anti-HER2 de tipo salvaje o variante al chip CM5 de proteína L en HBS-EP a 1  $\mu$ l/min durante 5 minutos. Se inyectaron el analito FcRn-His-GST, un FcRn fusionado con una etiqueta His y glutatión S transferasa, en diluciones seriadas entre 1 y 250 nM, durante 20 minutos asociación, 10 minutos disociación, en HBS-EP a 10  $\mu$ l/min. La respuesta, medida en unidades de resonancia (RU), se adquirió a 1.200 segundos después de la inyección del receptor, reflejando la unión cerca del estado estacionario. Un ciclo con anticuerpo y tampón sólo proporcionó respuesta de línea base. Se generaron representaciones de RU frente a 1 / log concentración y se ajustaron a una respuesta a la dosis sigmoidal usando regresión no lineal con GraphPad Prism.

La unión de los polipéptidos Fc a ligandos Fc también se hizo con AlphaScreen™ (Ensayo Homógeno de Proximidad Luminiscente Amplificada). AlphaScreen™ es un ensayo de proximidad luminiscente no radiactivo basado en lechos. La excitación con láser de un lecho donante excita al oxígeno, que si está lo suficientemente cerca del lecho aceptor generará una cascada de eventos quimioluminiscentes, dando lugar finalmente a emisión de fluorescencia a 520-620 nm. La ventaja principal del AlphaScreen™ es su sensibilidad. Debido a que un lecho donante emite hasta 60.000 moléculas de oxígeno excitado por segundo, la amplificación de la señal es extremadamente alta, permitiendo la detección tan abajo como niveles de attomolar ( $10^{-18}$ ). El anticuerpo de tipo salvaje se biotiniló por métodos estándar para la unión a lechos donantes de estreptavidina, y el ligando Fc etiquetado, por ejemplo FcRn, Fc $\gamma$ 1 o Proteína A, se unió a lechos aceptores quelado con glutatión. El AlphaScreen™ se aplicó como un ensayo de unión directa en el que las interacciones Fc/ligando Fc juntan los lechos donantes y aceptores para crear la señal medida. Además, el AlphaScreen™ se aplicó como un ensayo de competición para cribar polipéptidos Fc diseñados. En ausencia de polipéptidos Fc competidores, el anticuerpo de tipo salvaje y FcRn interaccionan y producen una señal a 520-620 nm. Los dominios de Fc no etiquetados compiten con la interacción Fc de tipo salvaje/FcRn, reduciendo la fluorescencia cuantitativamente para permitir la determinación de afinidades de unión relativas.

#### EJEMPLO 3: Propiedades de unión a FcRn de variantes de Fc.

La afinidad de unión de Fc de IgG1 a FcRn se midió con anticuerpos variantes usando AlphaScreen™. Los polipéptidos Fc eran parte de Alemtuzumab o Trastuzumab. Alemtuzumab (Campath®, Illex) es un anticuerpo monoclonal humanizado aprobado actualmente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica de células B (Hale et al., 1990, Tissue Antigens 35:118-127,). Trastuzumab (Herceptin®, Genentech) es un anticuerpo anti-HER2/neu para el tratamiento de cáncer de mama metastásico.

Los datos de AlphaScreen™ competitivo se recogieron para medir la unión relativa de las variantes de Fc comparada con el anticuerpo de tipo salvaje en 0,1 M fosfato de sodio pH6,0 con 25mM cloruro de sodio. Los ejemplos de la señal de AlphaScreen™ como una función de anticuerpo competidor se muestran en la Figura 12. Las 12 curvas de las variantes mostradas, aquellas de P257L, P257N, V279E, V279Q, V279Y, ^281S, E283F, V284E, L306Y, T307V, V308F, y Q311V, demuestran afinidad incrementada ya que cada curva de variante se desplaza a la izquierda del tipo salvaje en su caja. Los datos de AphaScreen™ de competición para las variantes de Fc de la presente invención se resumen en las Figuras 13 y 14. Los datos de AlphaScreen™ de competición adicionales en 0,1M fosfato de sodio pH 6,0 con 125mM cloruro de sodio se resumen en la Figura 21. Se lista la unión relativa a FcRn de la variante comparada con el tipo salvaje. Los valores mayores se uno demuestran unión mejorada de la variante de Fc a FcRn comparada con el tipo salvaje. Por ejemplo, la variante E283L y V284E tienen una unión 9,5 veces y 26 veces más fuerte que el tipo salvaje, respectivamente. Las medidas de resonancia de plasmón superficial de muchas variantes también muestran unión incrementada a FcRn como se muestra en la Figura 15 y 16.

En la posición 257, todas las variantes que eliminan el aminoácido, prolina, y sustituyen un aminoácido sin el núcleo N al enlace covalente de la cadena lateral, permiten que el núcleo sea más flexible lo que permite más libertad para que el dominio Fc se una mejor a FcRn. En particular, las variantes en la posición 257 a L y N tienen una unión

- fuerte a FcRn a pH 6, lo que demuestra que la cadena lateral de cuatro átomos y el patrón de ramificación gamma de la cadena lateral ayuda a que el dominio Fc establezca interacciones productivas, es decir fuertes, con FcRn. La posición 308 interacciona con la posición 257. Estas dos posiciones a su vez interaccionan con H310, que está implicada directamente en las interacciones Fc/FcRn (Tabla 2, Burmeister et al (1994) Nature 372:379-383.). Las variantes de Fc V308F y V08Y tienen un incremento de 2,9 veces y 4,3 veces en la afinidad para FcRn sobre el tipo salvaje (Figura 13). Las posiciones 279 y 385 interaccionan con FcRn ya que las variantes V279E, V279Q y V279Y y G385H y G385N todas tienen interacciones fuertes con FcRn. Estas variantes son todas a aminoácidos que son capaces de enlace de hidrógeno. Las secuencias de las regiones de Fc de IgG1 humana que comprenden varias modificaciones de la presente invención se muestran en la Figura 23.
- 10 La variante de Fc N434Y tiene una unión particularmente fuerte a FcRn a pH 6,0 como se muestra en la figura 13. La variante única N434Y tiene un incremento de 16 veces en la unión. Las combinaciones de esta variante con otras modificaciones dieron lugar a una unión incluso más fuerte. Por ejemplo, P257UN434Y, ^281S/N434Y, y V308F/N434Y muestran incrementos de 830 veces, 180 veces, y 350 veces en la unión a FcRn.

#### EJEMPLO 4: Variantes que incorporan inserciones y deleciones.

- 15 Se construyeron inserciones y deleciones que alteran la fuerza de las interacciones Fc/FcRn y se midieron sus propiedades de unión a varios ligandos Fc. Se diseñó una variante de Fc con un residuo Ser insertado entre los residuos 281 y 282, usando la numeración EU de Kabat et al, para incrementar las propiedades de unión a FcRn del dominio Fc. Esta variante se refiere como ^281S con "A" que significa una inserción después de la posición dada. Los datos de AlphaScreen™ que muestran la unión mejorada de ^281S se muestran en la Figura 12b y 21 a. La secuencia insertada, que puede ser más de un residuo, se proporciona después del número de posición. Esta variante de Fc se construyó en el anticuerpo kappa, IgG1 anti-HER2 trastuzumab (Herceptin®, Genetech) usando métodos descritos en la presente memoria. Una inserción en el sitio entre los residuos 281 y 282 desplaza los residuos del bucle Fc C-terminales del residuo 281 hacia el extremo C del bucle y altera el posicionamiento de la cadena lateral. Las variantes de Fc que comprenden sustituciones en las posiciones 282, 283, y 284 sugirieron que el desplazamiento C-terminal de este bucle fue beneficioso (Véase la Figura 14). También se construyó otra variante, una deleción de N286, algunas veces referida como N286#, para desplazar la posición de este bucle de unión a FcRn. Esta variante muestra una unión incrementada a FcRn a pH6,0 (Figura 14b).

- Los datos de AlphaScreen™ muestran la unión de la variante ^281S y otras variantes a FcRn. Estos datos de AlphaScreen™ se recogieron como un ensayo de unión directa. Los niveles mayores de señales quimioluminiscentes demuestran una unión más fuerte. Al elevarse las concentraciones de las variantes en este ensayo, se crean señales más fuertes. Estos datos a pH 6,0, en las Figuras 17a y 17b, demuestran la afinidad incrementada de ^281S, P257L, P257L/^281S (una variante de combinación sustitución/inserción) y otras variantes sobre el Fc de tipo salvaje. También se muestra una doble sustitución, T250Q/M428L, que previamente se ha mostrado que tiene una vida sérica incrementada en monos (Hinton et al., 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216 ). La inserción, ^281S, sola incrementa la unión Fc/FcRn. Además, ^281S incrementa adicionalmente la unión de P257L cuando las dos modificaciones se combinan en la variante P257L/^281S como se muestra en los puntos de datos de ~40nM. Los datos en la figura 17c demuestran que estas variantes no muestran unión incrementada a FcRn a pH 7,0. La afinidad reducida a pH 7,0 se desea para una vida media incrementada *in vivo*, porque permite la liberación de polipéptidos Fc de FcRn en el espacio extracelular, una etapa importante en el reciclado de Fc.

- 40 Los experimentos de resonancia de plasmón superficial también demuestran la unión mejorada de ^281S a FcRn. La Figura 18 muestra las unidades de respuesta creadas al unirse varias variantes de Fc a FcRn en la superficie del chip. Después de permitir que la variante se una completamente al chip, las unidades de repuesta se registran y se muestran en las ordenadas. La inserción, ^281S muestra propiedades de unión comparables con otras variantes que se muestra en la presente memoria que tienen afinidad incrementada para FcRn sobre el tipo salvaje (Véanse las figuras 13, 14 y 15, por ejemplo).

- La variante de deleción que comprende una deleción de N286, N286#, también muestra una afinidad incrementada para FcRn sobre el tipo salvaje. Esta variante tiene un incremento de 2,0 veces en la afinidad para FcRn como se muestra en la Figura 13. Los datos de éstas también son datos de AlphaScreen™ recogidos como un experimento de competición a pH 6,0. Las variantes se usan para inhibir la unión de Fc de tipo salvaje, unida al lecho donante, con FcRn, unido a los lechos aceptores. Fue necesario dos veces menos de N286# libre que Fc de tipo salvaje libre para inhibir la unión de los lechos donantes/aceptores a través del complejo Fc/FcRn. Esto demuestra la unión 2 veces más firme de N286# sobre el tipo salvaje.

- Otras variantes de Fc que comprenden inserciones o deleciones tienen una afinidad disminuida para FcRn. La variante de inserción, ^254N tiene una unión muy disminuida a FcRn como se esperaría de la naturaleza y posicionamiento de la variante. Esta variante pone la inserción, una Asn, en la mitad de un bucle de unión a FcRn. Esta inserción sólo tiene 1,1% de la unión de la afinidad de unión del tipo salvaje (Figura 13).

## EJEMPLO 5: Variantes de Combinación con características alteradas de FcRn y FcgammaR.

Como se muestra en la Figura 13b para el anticuerpo anti-HER2, la variante de Fc P257L tiene una afinidad incrementada para FcRn respecto a WT. P257L proporcionó una media de 2,6 veces de incremento en la afinidad para FcRn para FcRn humano, pH 6,0 en tampón fosfato con 25mM NaCl añadido. La adición de I332E o S239D/I332E a la variante P257L rindió variantes dobles y triples, P257L/I332E y S239D/P257L/I332E, que retienen la afinidad incrementada para FcRn. La variante S239D/I332E tiene una unión esencialmente no alterada para FcRn comparado con el tipo salvaje como se muestra en los ensayos AlphaScreen™ en la figura 14b. Estas variantes dobles y triples tuvieron una afinidad incrementada en 5 y 4 veces. Las variantes I332E y S239D/I332E tienen una unión mejorada a FcgammaR, en particular a FcgammaRIIIa (Véase US11/124620.). Las propiedades de unión a FcgammaR de algunas variantes de la presente invención se muestran en la Figura 25. Las propiedades de unión a proteína A de algunas variantes de la presente invención se muestran en la Figura 26. La unión a la proteína A se usa frecuentemente durante la purificación de proteínas que contienen Fc. La sustitución V308F también mejora la unión a FcRn a pH 6,0 (Figura 13e). V308F tiene una afinidad incrementada 3 veces como una única sustitución en el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab (Herceptin™, Genentech) y también tiene afinidad incrementada cuando se combina con sustituciones que incrementan la unión a FcgammaR, tales como I332E, S239D/I332E, y S298A/E333A/K334A (Lazar et al. 2006 Proc. Nat. Acad. Sci USA. 103(111):4005-4010, Shields et al. 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604). La unión incrementada a FcRn de G385H también se mantiene cuando se combina con sustituciones que mejoran FcgammaR, especialmente en la variante de sustitución triple S239D/I332E/G385H.

Las variantes con unión incrementada a FcRn pueden combinarse con variantes que reducen o inactivan la unión a FcgammaR y la proteína de complemento, C1q. La unión mejorada a FcRn incrementa el efecto de un receptor protector permitiendo una vida media mejorada. Las proteínas que contienen Fc también pueden ser captadas por células y metabolizadas a través de su interacción con el FcgammaR y la proteína C1q. Si las interacciones de Fc/FcgammaR y Fc/proteína C1q no se requieren para la eficacia del anticuerpo, pueden hacerse deleciones de estas interacciones. Las deleciones de estas interacciones pueden disminuir el efecto de un receptor degradante, permitiendo también de esta manera una vida media mejorada. En particular las variantes 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325A, 325L, y 328R (US11/396.495) pueden combinarse con variantes que mejoran FcRn para crear variantes con afinidad incrementada para FcRn y afinidad disminuida para FcgammaR o C1q. Estas variantes incluyen 235G/257C, 325A/385H, 325A/257L, 234G/308F, 234G/434Y, y 269R/308F/311V. Estas variantes pueden prepararse en dominios Fc de IgG1, aunque las interacciones reducidas con el FcgammaR o C1q también pueden conseguirse poniendo estas mutaciones en proteínas que comprenden dominios Fc de IgG2, IgG4, o IgG3. Si se ponen modificaciones de FcRn, tales como 257N, 257L, 257M, 308F, 311V en IgG2 se permite una reducción en la unión a FcgammaR e interacciones incrementadas con FcRn.

Las variantes con unión disminuida a FcRn pueden combinarse con variantes que tienen unión incrementada a FcgammaR o C1q. La unión disminuida a FcRn combinada con unión incrementada a FcgammaR puede ser beneficiosa para incrementar la cantidad de proteína que contiene Fc disponible para incitar funciones efectoras. La reducción de la unión a FcRn puede reducir la cantidad de la proteína que contiene Fc que es secuestrada por FcRn y así influir en la biodisponibilidad. Las modificaciones tales como I253V, S254N, S254# (delección de 254), T255H, y H435N reducen la unión Fc/FcRn (Figura 13) y pueden combinarse con variantes con unión mejorada a FcgammaR tales como S239D, I332E, H268E, G236A. Los dominios Fc resultantes, tales como los que comprenden I253V/S239D/I332E, I332E/H435N, o S254N/H268E, tienen unión reducida a FcRn y unión incrementada a FcgammaR.

Las variantes con unión disminuida a FcRn pueden combinarse con variantes con unión disminuida a FcgammaR. Esta combinación de unión disminuida a FcRn y FcgammaR es beneficiosa en aplicaciones tales como formación de imágenes en las que la proteína que contiene Fc se marca con una traza radiactiva o tóxica. Idealmente, la vida media de la proteína que comprende la traza radiactiva es similar a la vida media del radionúclido en sí mismo. Esto permite el aclaramiento de la traza del cuerpo en el mismo tiempo que la desintegración del radionúclido. Las interacciones reducidas de FcgammaR también permiten una disponibilidad óptima de la proteína que contiene Fc para su diana. Por ejemplo, si la proteína que contiene Fc es un anticuerpo, la unión reducida a FcgammaR permite que más anticuerpo esté disponible para el antígeno. Las combinaciones de variantes que afecten FcRn y FcgammaR, tales como 235G/254N, 236R/435N, 269R/I253V son buenas para esta aplicación.

## EJEMPLO 6: Variantes de Fc en la unión del anticuerpo OST577 a FcRn humano.

OST577 es un anticuerpo anti-antígeno de superficie de la Hepatitis B (Ehrlich et al. (1992) Hum. Antibodies Hybridomas 3:2-7.). Las secuencias de la cadena pesada y ligera se tomaron de la Base de Datos Kabat con KADBID 000653 (pesada) y KADBID 007557 (ligera) (Martin AC, Proteins. 1996 Mayo;25(1):130-3.). Los ADN que codifican las cadenas pesada y ligera se sintetizaron por Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA. Los anticuerpos OST577 de tipo salvaje y variante se expresaron y purificaron como las variantes de anti-HER2 (trastuzumab) en el EJEMPLO 1. Se llevaron a cabo ensayos de unión Biacore™ como en el EJEMPLO 2, con una proteína de fusión FcRn humano/Glutatión D transferasa (GST) unida a la superficie del chip. Como se muestra en la Figura 19, las variantes de Fc de la presente invención tienen unión alterada a FcRn humano. Las variantes con una unión incrementada se adhieren más fácilmente al FcRn en la superficie y causan una elevación mayor en Unidades de Respuesta (RU). Las variantes mostradas con modificación en la región de unión a FcRn todas tienen una afinidad

incrementada para FcRn comparada con la proteína de tipo salvaje. Estas variantes incluyen P257L, P257N, V308F, N434Y, P257L/N434Y y P257L/V308F. Se ha mostrado que la variante con la 3a RU mayor a 975 segundos, T250Q/M428L, incrementa la vida media de los anticuerpos OST577 en macacos (Hinton et al. 2004 Journal of Biological Chemistry 279(8):6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176:346-356.). En este conjunto de datos se incluye un anticuerpo con una región constante de cadena pesada híbrida IgG1/IgG2 que contiene las sustituciones S239D/I332E. Como se describe en el EJEMPLO 5, estas sustituciones incrementan la afinidad del anticuerpo para Fcγ<sub>1</sub>. Como se muestra en la Figura 19, estas sustituciones no alteran las propiedades de unión a FcRn, ya que las trazas del híbrido S239D/I332E Biacore™ se superponen con las trazas de tipo salvaje que contienen dominios CL1 kappa o lambda.

10 EJEMPLO 7: Afinidad de variantes de Fc para FcRn humano, de mono y de ratón.

Se crearon variantes de Fc en el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab como se describe en el EJEMPLO 1. Las trazas de resonancia de plasmón superficial (SPR) se recogieron como se describe en el EJEMPLO 2, excepto que FcRn humano, de macaco o de ratón se unió a la superficie del chip. Se recogieron dos curvas SPR para cada variante de Fc con diferentes cantidades de GST-FcRn unido a la superficie. Cada curva se ajustó a un modelo de unión 1:1 de Langmuir y los dos valores de K<sub>d</sub> resultantes se promediaron para producir un valor representativo para cada pareja variante-receptor. Los resultados se presentan en la Figura 20 como las veces de mejora en K<sub>d</sub> comparado con el trastuzumab de tipo salvaje. Por ejemplo, la variante V308F/Q311V tiene una unión 3,4 veces más firme a FcRn humano de la que tiene el tipo salvaje. V308F/Q311V también tiene una unión 3,7 veces y 5,1 veces más firme a FcRn de mono y ratón, respectivamente. Se ha mostrado que la variante M428L incrementa la vida media del anticuerpo (Hinton et al. 2004 Journal of Biological Chemistry 279(8):6213-6216) y tiene una unión incrementada 2,4, 2,0, y 2,1 veces a los FcRn humano, de mono y de ratón, respectivamente. Otras variantes, incluyendo P257L, P257N, N434Y, Q311V, V308F, V308F/N434Y, P257L/V308F, y P257UN434Y, también muestran una unión incrementada a pH6,0.

EJEMPLO 8: Variantes de FcRn en varios dominios Fc.

25 Las variantes de la presente invención pueden incorporarse en cualquier dominio constante, usando las técnicas de biología molecular y purificación descritas en la presente memoria, incluyendo las del EJEMPLO 1. Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 pueden usarse como se listan en la Figura 2. Además, pueden usarse combinaciones de dos o más dominios constantes diferentes. Por ejemplo, la Figura 24 lista algunas de las modificaciones encontradas en la presente invención incorporadas en un híbrido de IgG1 e IgG2. Este híbrido comprende el dominio CH1 de IgG2 y los dominios CH2 y CH3 de IgG1. IgG3 tiene una vida media menor en los seres humanos comparada con IgG1, IgG2, e IgG4 (7 días frente a ~21 días, Janeway, Travers, Walport, Shlomchik. Immunology, 5a ed. Garland Publishing c2001, Figura 4-16.) y por lo tanto es deseable en determinadas aplicaciones.

EJEMPLO 9: Creación de variante en un anticuerpo anti-VEGF.

35 Se produjeron anticuerpos anti-VEGF con una unión alterada usando los métodos descritos en la presente memoria, incluyendo el EJEMPLO 1. La cadena pesada de anti-VEGF de tipo salvaje comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYFTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTY
TGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWG
QGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCP
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

La cadena ligera de anti-VEGF de tipo salvaje comprende la secuencia de aminoácidos siguiente:

```
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPKAPKVLIVFTSSLSHSG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTL
40 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
```

Las variantes únicas y de combinación con una unión alterada incluyen las variantes mostradas en la Figura 28, que muestra las variantes producidas, el volumen de medio de cultivo usado, y el rendimiento resultante de las variantes de anticuerpo. La numeración de las variantes sigue el índice EU como en Kabat et al. Las variantes listadas en la Figura 28 se produjeron en IgG1 o VH híbrido que comprende secuencias tanto de IgG1 como IgG2. Estas variantes contienen la región variable que se une al antígeno VEGF. Se juzgó que todas las proteínas eran >90% puras por cromatografía de exclusión por tamaño y electroforesis en gel SDS.

#### EJEMPLO 10: Vida media *in vivo* de variantes de anticuerpo

Se estudió la farmacocinética de los anticuerpos de tipo salvaje y variante en ratones. Los ratones usados eran deficientes en la expresión de FcRn de ratón (ratones B6-Fcgrt<sup>Tm1Dcr</sup>) y eran heterocigotos para la activación génica de FcRn humano (hFcRn Tg - transgén) como se describe en Petkova et al. International Immunology 2006 Dic;18(12):1759-69. Petkova et al mostraron que la variante N434A tiene una vida media incrementada en estos ratones con activación génica de FcRn humano, lo que concuerda con resultados previos que muestran que la variante N434A tiene una vida media incrementada en monos (Solic US No. 11/208422, número de publicación US26067930A1). Se inyectaron a ratones hembra de 9-12 semanas de edad intravenosamente 2 mg/kg de anticuerpo en grupos de 6 ratones por anticuerpo. Se recogieron muestras de sangre a 1 hr, y en los días 1, 4, 8, 11, 15, 18, 21, 25 y 28 del plexo orbital. La concentración de cada anticuerpo en suero se midió con un ensayo ELISA en sandwich usando anticuerpos anti-Fc humano y detección con europio.

Los resultados del estudio se muestran en la Figura 27, que son datos representativos de dos estudios separados. Se muestra la media y desviación estándar de la media para las cuatro muestras. Claramente, la variante V308F tiene una vida media más larga, permaneciendo a concentraciones mensurables hasta 25 días. Las variantes WT y P257L y P257N se aclaran más rápidamente, teniendo sólo concentraciones mensurables hasta 15, 8, y 4 días, respectivamente. Las concentraciones séricas como una función del tiempo se ajustaron a un modelo no compartimental usando el paquete de software, WinNonLin (Pharsight Inc). La vida media terminal de la variante V308F fue 4,9 días, mientras las vidas medias terminales de las variantes WT y P257L y P257N fueron 3,0, 1,9 y 0,9 días, respectivamente. El área bajo las curvas (AUC) de la variante V308F fue 129 día\*ug/ml, mientras las de WT y las variantes P257L y P257N fueron 70, 38 y 38 día\*ug/ml, respectivamente.

#### EJEMPLO 11: Experimentos de unión a FcRn a pH 6,0.

Las variantes anti-VEGF de la presente invención se ensayaron para su capacidad de unión a FcRn humano con ensayos Biacore como se describe en el EJEMPLO 2 con algunas modificaciones. El FcRn humano se unió covalentemente a un chip CM5 en 10 mM acetato de sodio, pH 4,5 usando N-hidroxisuccinimida/N-etil-N'-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida (NHS/EDC) a una velocidad de flujo de 5 ul/min. El FcRn humano usado contenía la versión etiquetada con GST y HIS para ayudar en la purificación y otros ensayos. Se unieron aproximadamente 3.300 RU de FcRn al chip. La celda de flujo 1 se utilizó como simulación con NHS/EDC como un control negativo de la unión. El tampón de corrida fue 25mM tampón fosfato pH6,0, 150mM NaCl, 3mM EDTA y 0,005% (v/v) Tensioactivo P20. Los anticuerpos se eliminaron por lavado del chip de FcRn con el mismo tampón a pH7,4, lo que eliminó rápidamente todas las variantes ensayadas. Las trazas de asociación y disociación biacore se ajustaron a un modelo de intercambio conformacional para calcular una constante de unión en equilibrio aparente, Kd.

Los resultados demuestran que la variante V308F y muchas otras variantes tienen una unión mejorada a FcRn. El anticuerpo anti-VEGF de tipo salvaje tenía una Kd de 18 nM, que se diferencia considerablemente del valor reportado en Dall' Acqua et al (Dall' Acqua et al Journal of Immunology 2002, 169:5171-5180) debido a las diferencias en el diseño del ensayo y el ajuste de los datos. Nuestro formato de ensayo proporcionó resultados reproducibles si se usaba el chip de FcRn poco después de su creación. El chip de FcRn, sin embargo, se degradaba con el uso, posiblemente de la disociación de cualquiera de las dos cadenas de FcRn de la superficie. Los resultados demuestran la unión alterada de las variantes comparado con anti-VEGF de tipo salvaje. La Figura 29 muestra las veces de incremento en la fuerza de unión respecto al control de tipo salvaje. Los valores mayores de uno muestran que el anticuerpo variante tiene una afinidad mayor para FcRn que la proteína de tipo salvaje. La variante V308F, por ejemplo, se une a FcRn 4,5 veces más firmemente que el anticuerpo de tipo salvaje. La variante V308F/M428L se une a FcRn 12,3 veces más firmemente y la variante T307P/V308F se une a FcRn 3,16 veces más firmemente que la proteína de tipo salvaje. Ninguna de las variantes mostradas en la Figura 29 tuvo una afinidad reducida para FcRn comparado con el tipo salvaje (los valores serían menores de 1,0). La variante N434S tiene una afinidad de unión para FcRn 4,4 veces más fuerte que WT, comparable a V308F.

#### EJEMPLO 12: Experimentos de unión a FcRn transmembrana.

El ADNc de la cadena alfa y beta-2-microglobulina de FcRn se encargaron a OriGene Technologies Inc (Rockville, MD) y se transfectaron en células 293T para expresar FcRn funcional en la superficie celular. Se transfectaron 20 ug Fcgrt y 40 ug de ADN de beta-2-microglobulina con lipofectamina (Invitrogen Inc.) y se dejó que las células crecieran durante 3 días en medio DMEM con 10% suero con muy baja concentración de IgG. También se crecieron células control no transfectadas con las dos cadenas de FcRn. Varias cantidades de anticuerpos anti-VEGF (WT y variantes) se unieron a las células durante 30 minutos en 25mM tampón fosfato pH6,0, 150mM NaCl, 0,5% BSA y se lavaron 6-9 veces en 25mM tampón fosfato pH6,0, 150mM NaCl, 0,5% BSA más 0,003% igepal. Después del

lavado, los anticuerpos se fijaron a la superficie por tratamiento con la unión con 1% PFA. Los anticuerpos unidos se detectaron usando un Fab'<sub>2</sub> etiquetado con PE frente a los dominios Fab humanos y se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) usando un BD FACS Canto II. La media de dos muestras por anticuerpo se presenta en la Figura 30. Los ajustes de las curvas a los datos de la Figura 30 no proporcionan valores interpretables de CE50 porque muchas curvas no formaron una línea base superior saturando las células. Los anticuerpos pueden clasificarse en orden de su afinidad de unión, sin embargo, reportando el log[variante] en el que MFI es igual a 3.000, CE(MFI=3.000). Usando esta medida, los anticuerpos pueden listarse desde la afinidad más fuerte a más débil para FcRn como sigue: V308F/M428L, V259I/V308F, T250I/V308F, T250Q/M428L, N434S, T307Q/V308F, P257L, T307S/V308F, V308F, T256V/V308F, V308F/L309Y, y WT.

#### 10 EJEMPLO 13: Características de la variante, 434S.

Los anticuerpos que comprenden la modificación 434S tienen propiedades particularmente favorables que les hace variantes preferidas de la presente invención. En IgG1 humana, el residuo de tipo salvaje es una asparagina, Asn, en la posición 434 de manera que esta variante puede referirse como N434S en el contexto de IgG1 u otros dominios de Fc que contienen Asn, N, en la posición 434. Más generalmente, esta variante puede referirse simplemente como 434S. En la presente memoria, la variante 434S se ha producido con éxito tanto en el anticuerpo anti-HER2 trastuzumab como el anticuerpo anti-VEGF.

La Ser en la posición 434 tiene la capacidad de formar enlace de hidrógeno con FcRn bien directamente o indirectamente es decir, mediado por agua o moléculas de soluto. El oxígeno gamma de Ser en la posición 434 está cerca de los átomos de oxígeno del carbonilo de Gly131 y Pro134 en la molécula de FcRn, como se muestra en la Figura 32. La Figura 32 muestra un modelo del dominio Fc humano formando un complejo con FcRn humano. El dominio Fc en el modelo comprende la sustitución 434S, por lo tanto el residuo 434 es Ser en la Figura 32. El modelo se crea con tecnologías PDA® (Dahiyat y Mayo Protein Sci. 1996 May;5(5):895-903), la estructura cristalina del dominio Fc de rata unido al FcRn de rata (Martin et al. Mol Cell. 2001 Abr;7(4):867-77), y Pymol (Delano Scientific). El tamaño pequeño de Ser se acomoda fácilmente en la interfase entre las dos proteínas.

La variante de anticuerpo N434S tiene una afinidad de unión incrementada 4,4 veces para FcRn comparada con el anticuerpo de tipo salvaje como se muestra por medidas biacore™ (Figura 29). La variante también muestra una unión incrementada a FcRn unido a la superficie celular como se muestra por medidas de recuento celular (Figura 30).

Tomando como base los resultados mostrados en las Figuras 29 y 30, las variantes preferidas que comprenden 434S y otras modificaciones se espera que incluyan V308F/434S, 428L/434S, 252Y/434S, 259I/308F/434S, 250I/308F/434S, y 307Q/308F/434S.

#### EJEMPLO 14: Variantes Adicionales

Las variantes adicionales pueden basarse en los datos contenidos en la presente memoria y en la bibliografía (Dall'Acqua et al Journal of Biological Chemistry 2006 Ago 18;281(33):23514-24; Petkova et al. International Immunity 2006 Dic;18(12):1759-69; Dall'Acqua et al Journal of Immunology 2002, 169:5171-5180; Hinton et al, Journal of Biological Chemistry 2004 279(8): 6213-6216; Shields et al. Journal of Biological Chemistry 2001 276(9):6591-6604; Hinton et al. Journal of Immunology 2006, 176:346-356). Estas variantes incluyen las encontradas en la Figura 31.

Tomando como base los resultados en las Figuras 29 y 30 y los resultados de Dall'Acqua et al (Journal of Biological Chemistry 2006 Aug 18;281 (33):23514-24), las variantes preferidas incluyen Y319L, T307Q, V259I, M252Y, V259I/N434S, M428L/N434S, V308F/N434S, M252Y/S254T/T256E/N434S, M252Y/S254T/T256E/V308F, M252Y/S254T/T256E/M428L, V308F/M428UN434S, V259I/V308F/N434S, T307Q/V308F/N434S, T250I/V308F/N434S, V308F/Y319L/N434S, V259I/V308F/M428L, V259I/T307Q/V308F, T250I/V259I/V308F, V259I/V308F/Y319L, T307Q/V308F/L309Y, T307Q/V308F/Y319L, y T250Q/V308F/M428L.

Tomando como base los resultados en las Figuras 29 y 30, las variantes más preferidas incluyen Y319L, T307Q, V259I, M252Y, V259I/N434S, M428L/N434S, V308F/N434S, V308F/M428UN434S, V259I/V308F/N434S, T307Q/V308F/N434S, T250I/V308F/N434S, V308F/Y319L/N434S, V259I/V308F/M428L, V259I/T307Q/V308F, T250I/V259I/V308F, V259I/V308F/Y319L, T307Q/V308F/L309Y, T307Q/V308F/Y319L, y T250Q/V308F/M428L.

Aunque se han descrito anteriormente realizaciones particulares de la invención para propósitos de ilustración, los expertos en la técnica apreciarán que pueden hacerse numerosas variaciones de los detalles sin alejarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> XENCOR, INC. CHAMBERLAIN, Aaron Keith DAHIYAT, Bassil I. DESJARLAIS, John Rudolph KARKI, Sher Bahadur
- 5 <120> Variantes de Fc con Unión Alterada a FcRn
- <130> 5026-US02
- 10 <140> 11/932151 <141> 2007-10-31
- <150> 60/951,536 <151> 2007-07-24
- <150> 11/436,266 <151> 2006-05-17
- 15 <150> 11/274,065 <151> 2005-11-14
- <150> 60/627,763 <151> 2004-11-12
- 20 <150> 60/642,886 <151> 2005-01-11
- <150> 60/649,508 <151> 2005-02-02
- <150> 60/662,468 <151> 2005-03-15
- 25 <150> 60/681,607 <151> 2005-05-16
- <150> 60/690,200 <151> 2005-06-13
- 30 <150> 60/696,609 <151> 2005-07-05
- <150> 60/703,018 <151> 2005-07-27
- <150> 60/726,453 <151> 2005-10-12
- 35 <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.5
- 40 <210> 1
- <211> 227
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 45 <400> 1

**Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly**  
**1 5 10 15**

ES 2 537 282 T3

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

Pro Gly Lys  
 225

<210> 2  
 <211> 223  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

10 Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val



ES 2 537 282 T3

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
35 40 45

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val  
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
65 70 75 80

Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
130 135 140

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

Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr  
165 170 175

Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
180 185 190

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser  
195 200 205

Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
210 215 220

Leu Ser Pro Gly Lys  
225

<210> 4

<211> 224

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

10 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser



ES 2 537 282 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
20 25 30

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
50 55 60

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
65 70 75 80

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
85 90 95

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

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

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
130 135 140

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
145 150 155 160

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
165 170 175

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
180 185 190

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
195 200 205

<210> 6  
<211> 205  
5 <212> PRT  
<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp  
20 25 30

10 Pro Glu Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr

ES 2 537 282 T3

35 40 45

Ala Gln Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser  
50 55 60

Val Ser Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr  
65 70 75 80

Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
85 90 95

Ser Ile Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr  
100 105 110

Met Ala Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr  
115 120 125

Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys  
130 135 140

Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met  
145 150 155 160

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys  
165 170 175

Glu Thr Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu  
180 185 190

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His  
195 200 205

<210> 7  
 <211> 256  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser Pro Ala Pro  
1 5 10 15

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

Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp  
35 40 45

Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe  
50 55 60

10

ES 2 537 282 T3

Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln  
65 70 75 80

Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr  
85 90 95

Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys  
100 105 110

Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln  
115 120 125

Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu  
130 135 140

Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg  
145 150 155 160

Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg  
165 170 175

Pro Ser Ser Pro Gly Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe  
180 185 190

Tyr Pro Pro Glu Leu Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala  
195 200 205

Gly Thr Gly Gln Gly Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His  
210 215 220

Ala Ser Ser Ser Leu Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys  
225 230 235 240

Cys Ile Val Gln His Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu  
245 250 255

<210> 8

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 8

Leu Pro Leu Met Tyr His Leu Ala Ala Val Ser Asp Leu Ser Thr Gly  
1 5 10 15

Leu Pro Ser Phe Trp Ala Thr Gly Trp Leu Gly Ala Gln Gln Tyr Leu  
20 25 30

10 Thr Tyr Asn Asn Leu Arg Gln Glu Ala Asp Pro Cys Gly Ala Trp Ile



ES 2 537 282 T3

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu  
1 5 10 15

Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro  
20 25 30

Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys  
35 40 45

Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu  
50 55 60

Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys  
65 70 75 80

Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp  
85 90 95

Arg Asp Met

<210> 10

<211> 99

5 <212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 10

Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu  
1 5 10 15

Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gln Phe His Pro  
20 25 30

Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Asn  
35 40 45

Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile  
50 55 60

Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Thr Asp Val Tyr Ala Cys  
65 70 75 80

Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys Glu Pro Lys Thr Val Thr Trp Asp  
85 90 95

10 Arg Asp Met

<210> 11

<211> 450

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Trastuzumab Cadena pesada

20 <400> 11

ES 2 537 282 T3

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

ES 2 537 282 T3

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys  
450

<210> 12

<211> 214

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Trastuzumab cadena ligera

10

<400> 12

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

5

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 14  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> P257L IgG1

10 <400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

ES 2 537 282 T3

275

280

285

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 16  
<211> 330  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> V308F IgG1

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

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

<210> 17  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>  
 <223> Q311V IgG1

10

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
290 295 300  
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 18  
<211> 330  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

5

ES 2 537 282 T3

<220>

<223> G385H IgG1

<400> 18

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 19  
 <211> 330  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> WT híbrido

10 <400> 19

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 20  
<211> 330  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> P257L Híbrido

10 <400> 20

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 21  
<211> 330  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> P257N Híbrido

10 <400> 21

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

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

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

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

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

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

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys



ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 537 282 T3

245 250 255

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 23  
<211> 330  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 537 282 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 24

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> G385H Híbrido

10

<400> 24

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

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

ES 2 537 282 T3

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn His Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para incrementar la vida media de un anticuerpo IgG humano que comprende modificar una región Fc de un anticuerpo IgG humano, en el que dicha región Fc se modifica para sustituir una asparagina con una serina en la posición 434, en el que dicho anticuerpo IgG humano modificado es un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4 y en el que la numeración es según el índice EU en Kabat et al.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que comprende una región Fc.

# Figura 1

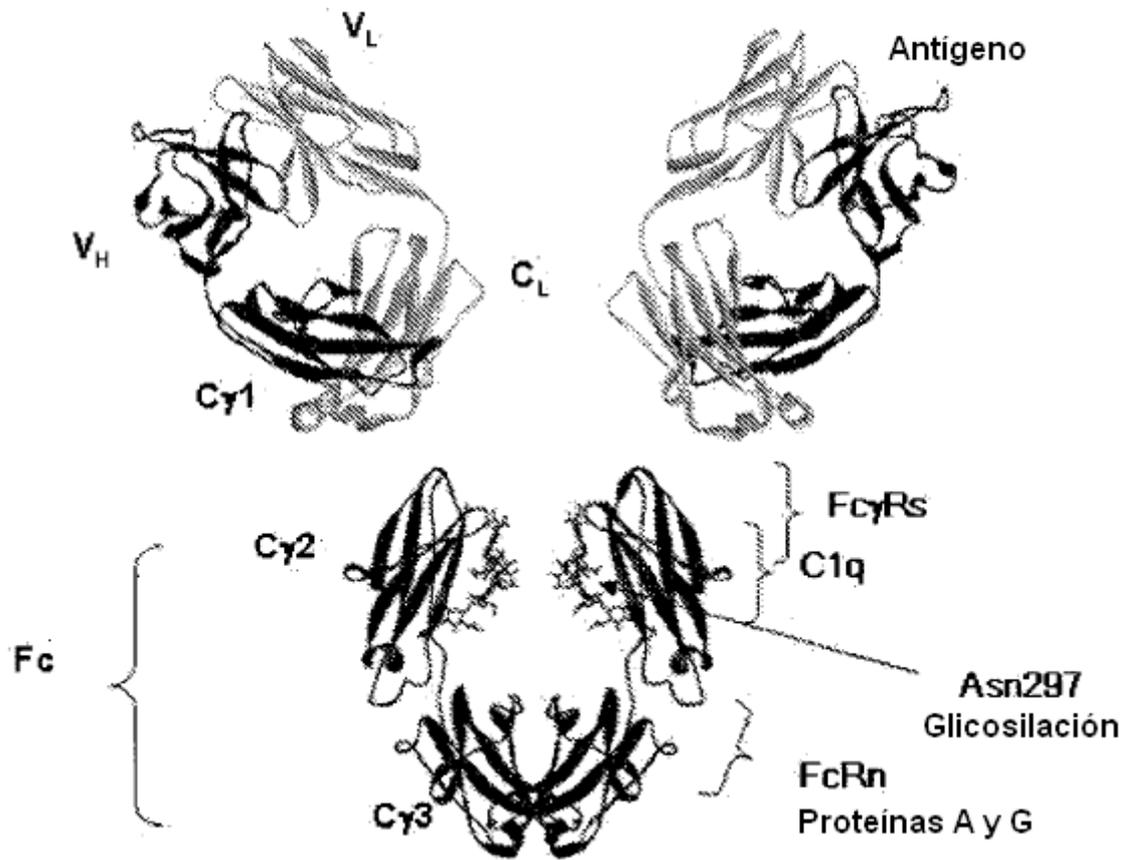










FIGURA 3 (cont.)

Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	P	E	G	T	P	R	G	P	Q	V	Y	T	M	A	P	P	K
		356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	E	E	M	T	Q	S	Q	V	S	I	T	C	M	V	K	G	F
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	Y	P	P	D	I	Y	T	E	W	K	M	N	G	Q	P	Q	E
		390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	N	Y	K	N	T	P	P	T	M	D	T	D	G	S	Y	F	L
		407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	Y	S	K	L	N	V	K	K	E	T	W	Q	Q	G	N	T	F
		424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	T	C	S	V	L	H	E	G	L	H	N	H	H	T	E	K	S
		441	442	443														
Fc Humano	1DN2.pdb Cadena A	L	S	L														
Fc de Rata	111A.pdb Cadena C	L	S	H														

**FIGURA 4**

(SEQ ID NO. 7)	FcRn Humano	Cadena Pesada Cadena A	Número AA 1EXU.pdb																
			4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16				
(SEQ ID NO. 8)	FcRn de Rata	Cadena Pesada Cadena A	-	L	P	L	L	M	Y	H	L	A	A	V	S	D			
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
P	A	P	G	T	P	A	F	W	V	S	G	W	L	G	P	Q	Q	Y	L
L	S	T	G	L	P	S	F	W	A	T	G	W	L	G	A	Q	Q	Y	L
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
S	Y	N	S	L	R	G	E	A	E	P	C	G	A	W	-	-	-	-	-
T	Y	N	N	L	R	Q	E	A	D	P	C	G	A	W	I	W	E	N	Q
57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
-	-	-	Y	W	E	K	E	T	T	D	L	R	I	K	E	K	L	F	L
V	S	W	Y	W	E	K	E	T	T	D	L	K	S	K	E	Q	L	F	L
77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
E	A	F	K	A	L	-	G	G	G	K	P	Y	T	L	Q	G	L	L	L
E	A	I	R	T	L	E	N	Q	I	N	G	T	F	T	L	Q	G	L	L
95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
G	C	E	L	G	P	D	N	T	S	V	P	T	A	K	F	A	L	N	G
G	C	E	L	A	P	D	N	S	S	L	P	T	A	V	F	A	L	N	G

FIGURA 4 (cont.)

115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
E	E	F	M	N	F	D	L	K	Q	G	T	W	G	G	D	W	P	E	A
E	E	F	M	R	F	N	P	R	T	G	N	W	S	G	E	W	P	E	T
135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154
L	A	I	S	Q	R	W	Q	Q	Q	D	K	A	A	N	K	E	L	T	F
D	I	V	G	N	L	W	M	K	Q	P	E	A	A	R	K	E	S	E	F
155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174
L	L	F	S	C	P	H	R	L	R	E	H	L	E	R	G	R	G	N	L
L	L	T	S	C	P	E	R	L	L	G	H	L	E	R	G	R	Q	N	L
175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194
E	W	K	E	P	P	S	M	R	L	K	A	R	P	S	S	P	G	F	S
E	W	K	E	P	P	S	M	R	L	K	A	R	P	G	N	S	G	S	S
195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
V	L	T	C	S	A	F	S	F	Y	P	P	E	L	Q	L	R	F	L	R
V	L	T	C	A	A	F	S	F	Y	P	P	E	L	K	F	R	F	L	R
215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234
N	G	L	A	A	G	T	G	Q	G	D	F	G	P	N	S	D	G	S	F
N	G	L	A	S	G	S	G	N	C	S	T	G	P	N	G	D	G	S	F
235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254
H	A	S	S	S	L	T	V	K	S	G	D	E	H	H	Y	C	C	I	V
H	A	W	S	L	L	E	V	K	R	G	D	E	H	H	Y	Q	C	Q	V
255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267							
Q	H	A	G	L	A	Q	P	L	R	V	E	L							
E	H	E	G	L	A	Q	P	L	T	V	D	L							

FIGURA 5

(SEQ ID NO. 9)	Beta-2-microglobulina, Humana										Cadena Ligera										Número AA 1EXU.pdb																											
	Beta-2-microglobulina, Rata										Cadena Ligera										1EXU.pdb Cadena B										111A.pdb Cadena B																	
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	S	R	H	P	A	E	N	G	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	S	N	F	L	N	C	Y	V	S
	S	R	H	P	P	E	N	G	K	P	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	P	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	P	N	F	L	N	C	Y	V	S	K	P	N	F	L	N	C	Y	V	S
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
	G	F	H	P	S	D	I	E	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I	V	D	L	L	K	N	G	E	R	I
	Q	F	H	P	P	Q	I	E	I	E	L	L	K	N	G	K	K	I	I	E	L	L	K	N	G	K	K	I	I	E	L	L	K	N	G	K	K	I	I	E	L	L	K	N	G	K	K	I
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
	E	K	V	E	H	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	L
	P	N	I	E	M	S	D	L	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	I	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	I	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	I	S	F	S	K	D	W	S	F	Y	I
	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
	L	Y	Y	T	E	F	T	P	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V	T	E	K	D	E	Y	A	C	R	V
	L	A	H	T	E	F	T	P	T	E	T	D	V	Y	A	C	R	V	T	E	T	D	V	Y	A	C	R	V	T	E	T	D	V	Y	A	C	R	V	T	E	T	D	V	Y	A	C	R	V
	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99		91	92	93	94	95	96	97	98	99		91	92	93	94	95	96	97	98	99		91	92	93	94	95	96	97	98	99	
	N	H	V	T	L	S	Q	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M		P	K	I	V	K	W	D	R	D	M	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M	P	K	I	V	K	W	D	R	D	M
	K	H	V	T	L	K	E	P	K	T	V	T	W	D	R	D	M		P	K	T	V	T	W	D	R	D	M	P	K	T	V	T	W	D	R	D	M	P	K	T	V	T	W	D	R	D	M

Figura 6

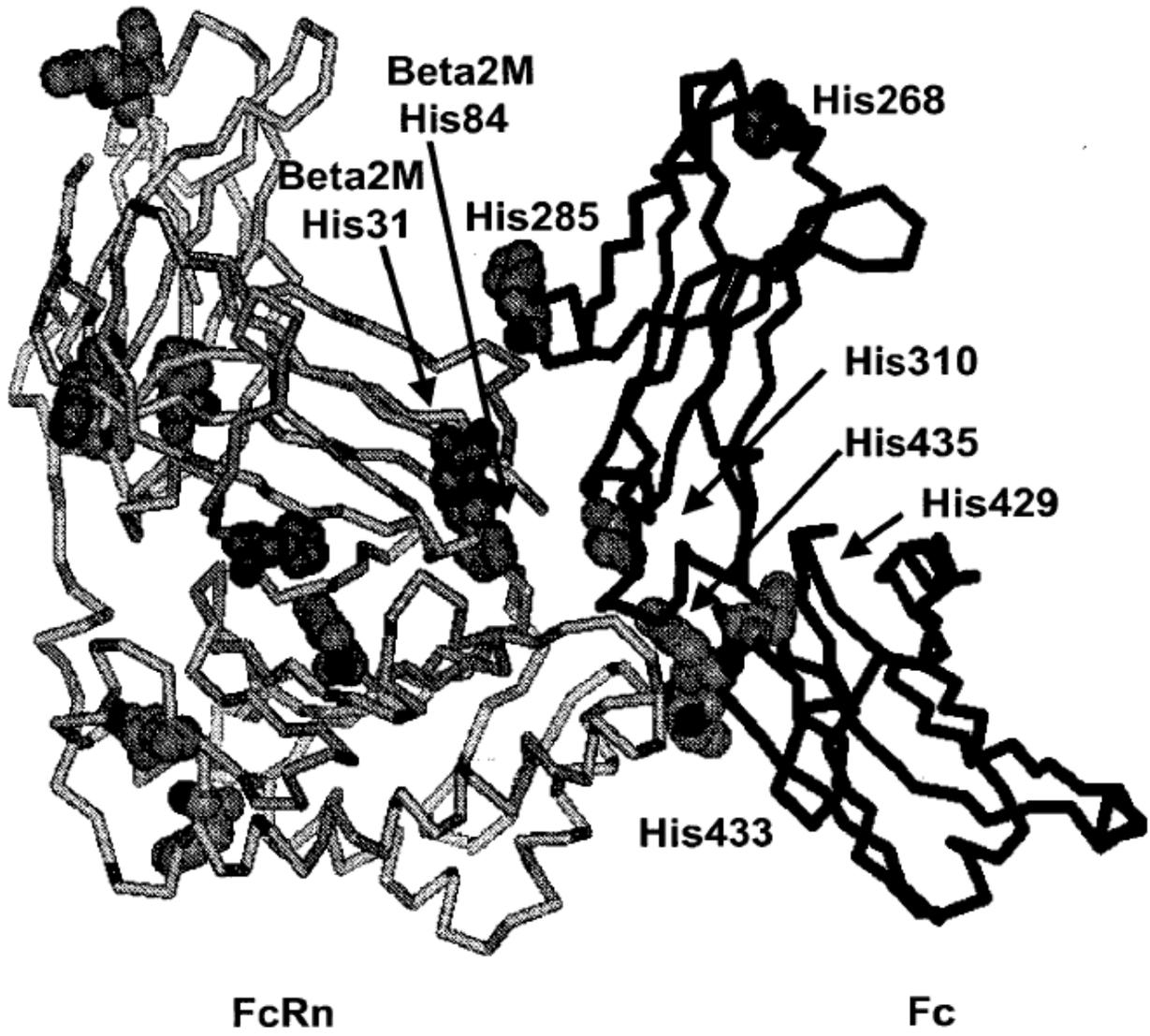


Figura 7

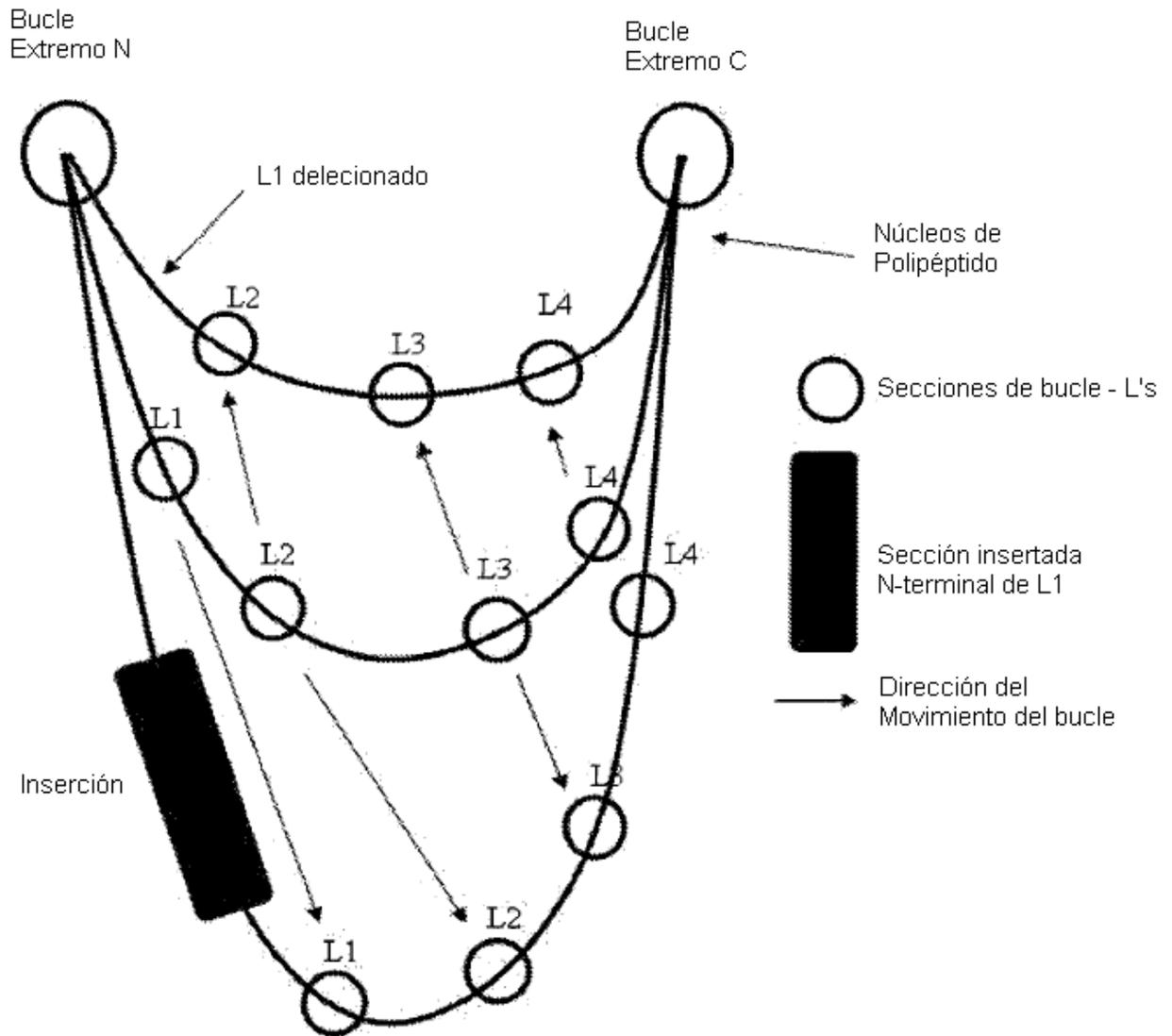


Figura 8a

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución						
K	246H	R	255E	V	279D	V	284K
K	246S	R	255F	V	279F	V	284P
P	247D	R	255H	V	279G	V	284Q
P	247T	R	255K	V	279H	V	284R
K	248H	R	255S	V	279I	V	284S
K	248P	R	255V	V	279K	V	284Y
K	248Q	T	256E	V	279L	H	285S
K	248R	T	256H	V	279M	H	285V
K	248Y	T	256V	V	279N	N	286#
D	249T	P	257A	V	279P	N	286L
D	249W	P	257C	V	279Q	A	287H
L	251D	P	257D	V	279R	A	287S
L	251E	P	257E	V	279S	A	287V
L	251H	P	257F	V	279T	A	287Y
L	251I	P	257G	V	279W	K	288H
L	251K	P	257H	V	279Y	K	288Q
L	251M	P	257I	D	280E	K	288R
L	251N	P	257K	D	280H	K	288S
L	251T	P	257L	^	^281A	V	305H
L	251V	P	257M	^	^281D	V	305T
L	251Y	P	257N	^	^281S	L	306F
M	252F	P	257Q	^	^281T	L	306H
M	252L	P	257R	V	282D	L	306I
I	253L	P	257S	V	282F	L	306N
I	253T	P	257T	V	282H	L	306T
I	253V	P	257V	V	282I	L	306V
S	254H	P	257W	V	282T	L	306Y
S	254L	P	257Y	E	283F	T	307D
S	254N	E	258R	E	283I	T	307V
S	254T	E	258V	E	283L	T	307Y
S	254V	V	279A	E	283Y	V	308A
^	^254N	V	279C	V	284H	V	308C

Figura 8b

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución						
V	308D	N	315E	G	385N	E	430H
V	308E	N	315G	G	385P	E	430K
V	308F	N	315H	G	385Q	E	430L
V	308G	N	315Q	G	385R	E	430Q
V	308H	N	315S	G	385S	E	430Y
V	308I	N	315T	G	385T	A	431G
V	308K	K	317H	G	385V	A	431H
V	308L	K	317S	G	385W	A	431I
V	308M	A	339P	G	385Y	A	431P
V	308N	K	340P	Q	386E	A	431S
V	308P	G	341S	Q	386H	L	432F
V	308Q	P	374H	Q	386K	L	432H
V	308R	P	374S	P	387#	L	432N
V	308S	D	376H	P	387A	L	432S
V	308T	D	376L	P	387H	L	432V
V	308W	A	378H	P	387K	H	433E
V	308Y	A	378N	P	387Q	H	433N
L	309F	E	380T	N	389E	H	433P
L	309H	E	380Y	N	389H	H	433R
L	309I	E	382H	S	426E	H	433S
L	309N	S	383H	S	426H	N	434H
L	309P	S	383K	S	426L	N	434Q
L	309Q	S	383Q	S	426N	N	434S
L	309V	N	384E	S	426R	N	434Y
L	309Y	N	384G	S	426V	H	435N
H	310K	N	384H	S	426Y	Y	436E
H	310N	G	385A	V	427I	Y	436F
H	310T	G	385C	H	429D	Y	436H
Q	311H	G	385D	H	429F	Y	436L
Q	311L	G	385E	H	429K	Y	436Q
Q	311S	G	385F	H	429N	Y	436V
Q	311T	G	385H	H	429Q	Y	436W
Q	311V	G	385I	H	429S	T	437E
Q	311W	G	385K	H	429T	T	437V
D	312H	G	385L	H	429Y	Q	438E
W	313Y	G	385M	E	430D	Q	438H
						Q	438K

Figura 9a

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución						
K	246H	R	255S	V	279N	A	287S
K	246S	R	255V	V	279P	A	287V
P	247D	T	256H	V	279Q	A	287Y
P	247T	T	256V	V	279R	K	288H
K	248H	P	257A	V	279S	K	288Q
K	248P	P	257C	V	279T	K	288S
K	248Q	P	257D	V	279W	V	305H
K	248R	P	257E	V	279Y	V	305T
K	248Y	P	257F	D	280H	L	306F
D	249T	P	257G	^	^281A	L	306H
D	249W	P	257H	^	^281D	L	306I
L	251D	P	257I	^	^281S	L	306N
L	251E	P	257K	^	^281T	L	306T
L	251H	P	257L	V	282D	L	306V
L	251I	P	257M	V	282F	L	306Y
L	251K	P	257N	V	282H	T	307D
L	251M	P	257Q	V	282I	T	307V
L	251N	P	257R	V	282T	T	307Y
L	251T	P	257S	E	283F	V	308C
L	251V	P	257T	E	283I	V	308E
L	251Y	P	257V	E	283L	V	308F
M	252L	P	257W	E	283Y	V	308G
I	253L	P	257Y	V	284H	V	308H
I	253T	E	258R	V	284K	V	308I
I	253V	E	258V	V	284P	V	308K
S	254H	V	279A	V	284Q	V	308L
S	254L	V	279C	V	284R	V	308M
S	254N	V	279D	V	284S	V	308N
S	254V	V	279F	V	284Y	V	308P
^	^254N	V	279G	H	285S	V	308Q
R	255E	V	279H	H	285V	V	308R
R	255F	V	279I	N	286#	V	308S
R	255H	V	279K	N	286L	V	308W
R	255K	V	279M	A	287H	V	308Y

## Figura 9b

Figura 9b

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución						
L	309F	E	382H	S	426H	H	433S
L	309H	S	383H	S	426L	N	434H
L	309N	S	383K	S	426N	N	434Q
L	309Q	S	383Q	S	426R	N	434S
L	309V	N	384E	S	426V	H	435N
L	309Y	N	384G	S	426Y	Y	436E
H	310K	N	384H	V	427I	Y	436F
H	310N	G	385A	H	429D	Y	436L
H	310T	G	385C	H	429F	Y	436V
Q	311L	G	385F	H	429K	Y	436W
Q	311T	G	385H	H	429N	T	437E
Q	311V	G	385I	H	429Q	T	437V
Q	311W	G	385K	H	429S	Q	438H
D	312H	G	385L	H	429T	Q	438K
W	313Y	G	385M	H	429Y		
N	315E	G	385N	E	430D		
N	315G	G	385P	E	430H		
N	315H	G	385Q	E	430K		
N	315Q	G	385S	E	430L		
N	315S	G	385T	E	430Q		
N	315T	G	385V	E	430Y		
K	317H	G	385W	A	431G		
K	317S	G	385Y	A	431H		
A	339P	Q	386E	A	431I		
K	340P	Q	386H	A	431P		
G	341S	Q	386K	A	431S		
P	374H	P	387#	L	432F		
P	374S	P	387A	L	432H		
D	376H	P	387H	L	432N		
D	376L	P	387K	L	432S		
A	378H	P	387Q	L	432V		
A	378N	N	389E	H	433E		
E	380T	N	389H	H	433N		
E	380Y	S	426E	H	433P		

## Figura 10a

Figura 10a

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución						
K	246H	P	257I	N	286L	W	313Y
K	246S	P	257L	A	287V	N	315G
P	247D	P	257M	K	288Q	N	315Q
P	247T	P	257N	K	288S	N	315S
K	248P	P	257Q	V	305T	N	315T
K	248Q	P	257S	L	306F	A	339P
K	248Y	P	257T	L	306H	K	340P
D	249T	P	257V	L	306I	G	341S
D	249W	P	257W	L	306N	P	374H
L	251D	P	257Y	L	306T	P	374S
L	251E	E	258V	L	306V	D	376L
L	251H	V	279A	L	306Y	A	378H
L	251I	V	279C	T	307V	A	378N
L	251T	V	279F	V	308C	E	380T
L	251V	V	279I	V	308F	E	380Y
M	252L	V	279P	V	308G	E	382H
I	253L	V	279S	V	308L	S	383Q
I	253T	V	279T	V	308M	N	384E
I	253V	V	279W	V	308N	N	384G
S	254H	V	279Y	V	308P	N	384H
S	254L	^	^281A	V	308Q	G	385A
S	254N	^	^281D	V	308S	G	385C
S	254V	^	^281S	V	308W	G	385F
^	^254N	^	^281T	V	308Y	G	385I
R	255E	V	282F	L	309F	G	385L
R	255H	V	282I	L	309N	G	385M
R	255K	V	282T	L	309Q	G	385N
R	255V	E	283F	L	309V	G	385P
T	256H	E	283I	L	309Y	G	385Q
T	256V	E	283L	H	310T	G	385S
P	257A	E	283Y	Q	311L	G	385T
P	257C	V	284P	Q	311T	G	385V
P	257F	H	285V	Q	311V	G	385W
P	257G	N	286#	Q	311W	G	385Y

**Figura 10b**

Figura 10b

IgG1 Humana WT	Posición Sustitución	IgG1 Humana WT	Posición Sustitución
Q	386E	N	434H
Q	386H	N	434Q
Q	386K	N	434S
P	387#	H	435N
P	387A	Y	436F
P	387H	Y	436L
P	387K	Y	436V
P	387Q	Y	436W
N	389H	T	437E
S	426L	T	437V
S	426N		
S	426V		
S	426Y		
V	427I		
H	429D		
H	429F		
H	429K		
H	429N		
H	429Q		
H	429S		
H	429T		
H	429Y		
E	430L		
A	431G		
A	431I		
A	431P		
A	431S		
L	432F		
L	432H		
L	432V		
H	433E		
H	433N		
H	433P		
H	433S		

Figura 11

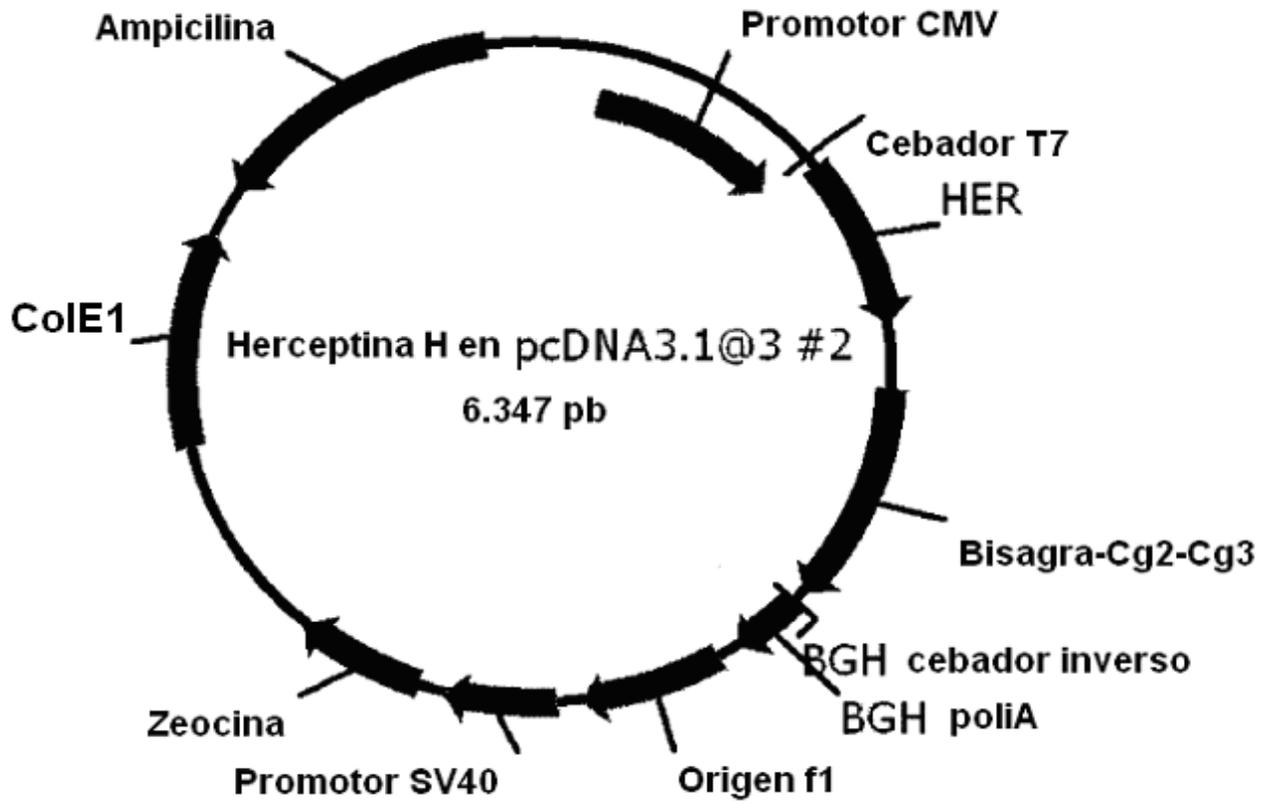


Figura 12a

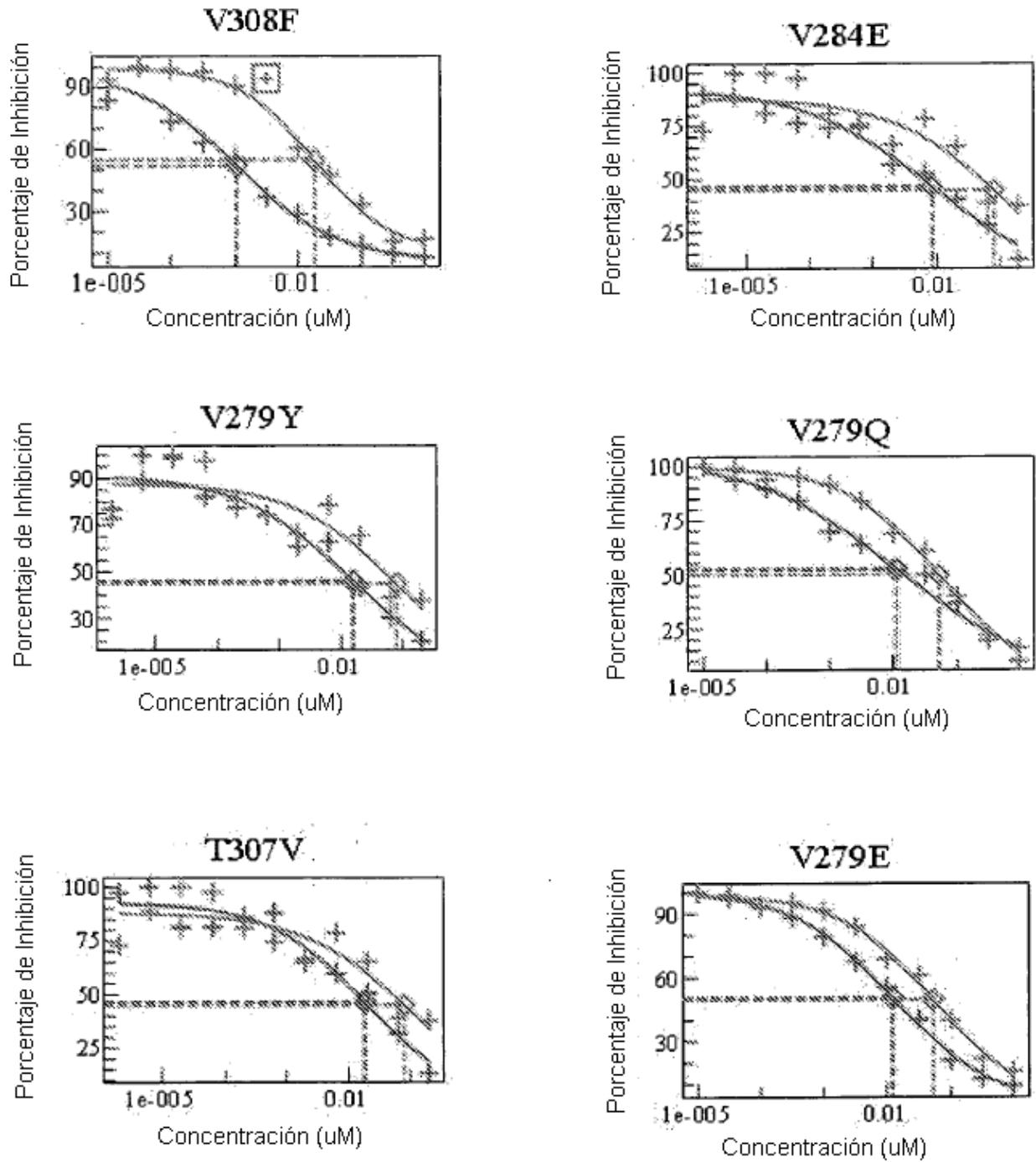


Figura 12b

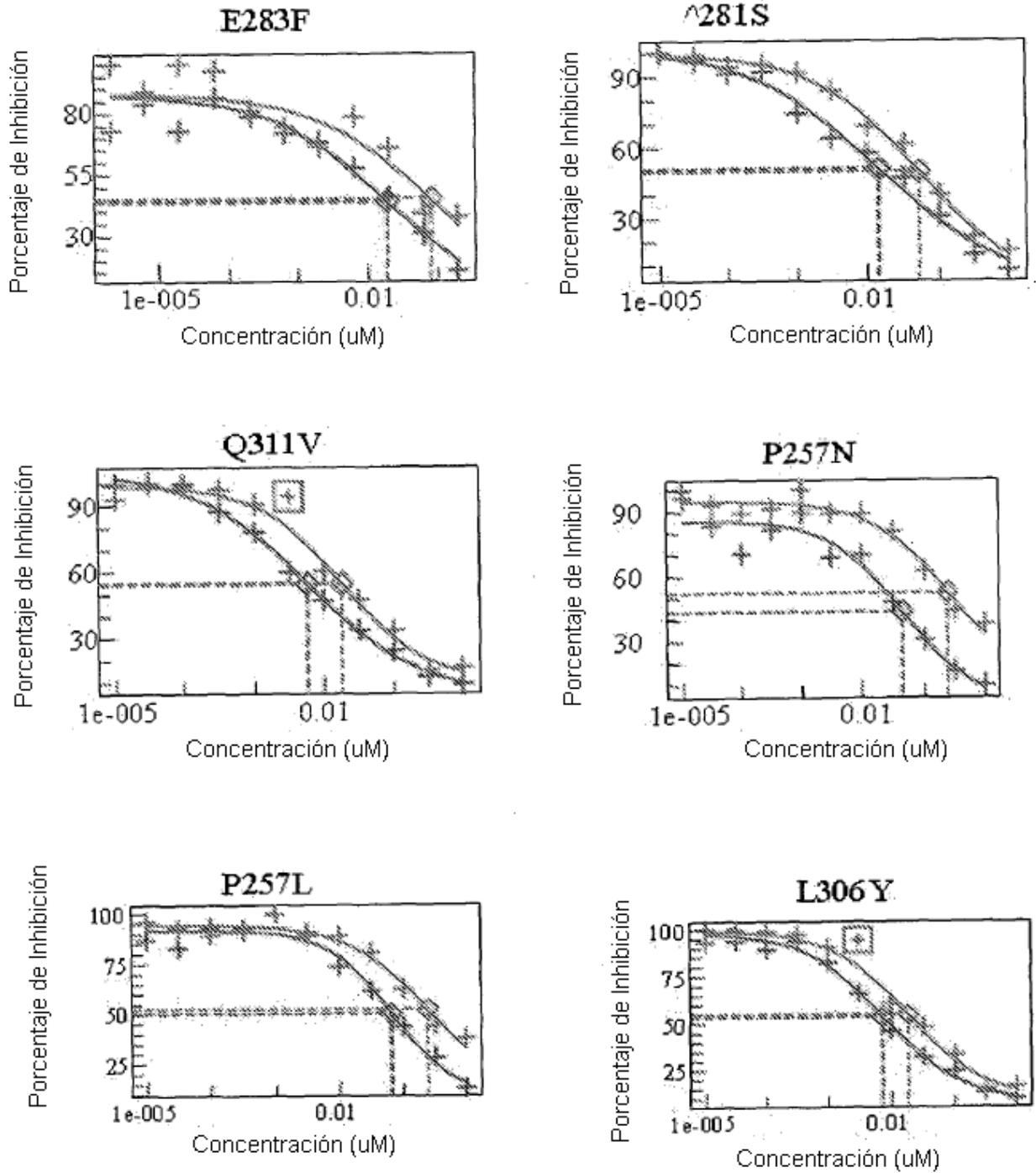


Figura 13a

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
WT	Herceptina-IgG1		1	19
WT	Herceptina-IgG2		0.45	2
K246H	Herceptina-IgG1		0.65	1
K246S	Herceptina-IgG1		0.55	1
P247D	Herceptina-IgG1		1.45	1
P247T	Herceptina-IgG1		0.23	1
K248H	Herceptina-IgG1		0.62	2
K248P	Herceptina-IgG1			0
K248Q	Herceptina-IgG1		1	1
K248R	Herceptina-IgG1		0.44	1
K248Y	Herceptina-IgG1		2.09	3
D249T	Herceptina-IgG1			0
D249W	Herceptina-IgG1		0.56	1
T250Q	Herceptina-IgG1			0
T250Q/M428L	Herceptina-IgG1		2.06	13
L251D	Herceptina-IgG1		0.28	2
L251E	Herceptina-IgG1		0.07	1
L251H	Herceptina-IgG1		0.57	1
L251I	Herceptina-IgG1		0.28	1
L251K	Herceptina-IgG1		0.1	1
L251M	Herceptina-IgG1		0.26	1
L251N	Herceptina-IgG1		0.1	1
L251T	Herceptina-IgG1		1.12	1
L251V	Herceptina-IgG1		0.29	1
L251Y	Herceptina-IgG1		0.55	1
M252F	Herceptina-IgG1		0.7	1
M252L	Herceptina-IgG1		0.1	1
M252W	Herceptina-IgG1		7.55	7
M252Y	Herceptina-IgG1			0
M252Y/S254T/T256E	Herceptina-IgG1			0
M252Y/P257L	Herceptina-IgG1		1.22	1
M252Y/P257N	Herceptina-IgG1		25.48	3
M252Y/V279Q	Herceptina-IgG1		5.62	3
M252Y/V308F	Herceptina-IgG1		1.44	2
I253L	Herceptina-IgG1		0.32	1
I253T	Herceptina-IgG1			0
I253V	Herceptina-IgG1		0.28	1
S254H	Herceptina-IgG1		1.34	2
S254L	Herceptina-IgG1		0.61	1
S254N	Herceptina-IgG1		0.15	1
S254T	Herceptina-IgG1		0.61	1
S254V	Herceptina-IgG1		0.62	1
^254N	Herceptina-IgG1		0.01	1

Figura 13b

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
R255E	Herceptina-IgG1			0
R255F	Herceptina-IgG1			0
R255H	Herceptina-IgG1		0.69	2
R255K	Herceptina-IgG1		0.22	1
R255S	Herceptina-IgG1			0
R255V	Herceptina-IgG1		0.46	1
T256E	Herceptina-IgG1			0
T256H	Herceptina-IgG1		0.06	1
T256V	Herceptina-IgG1		0.29	1
P257A	Herceptina-IgG1		1.88	1
P257C	Herceptina-IgG1		15.69	1
P257D	Herceptina-IgG1		0.08	1
P257E	Herceptina-IgG1		0.13	1
P257F	Herceptina-IgG1		0.05	1
P257G	Herceptina-IgG1		0.76	1
P257H	Herceptina-IgG1		0.49	1
P257I	Herceptina-IgG1		1.8	2
P257K	Herceptina-IgG1		0.07	1
P257L	Herceptina-IgG1		2.63	6
P257L	Herceptina-IgG1	I332E	5.04	1
P257L	Herceptina-IgG1	S239D/I332E	3.96	2
P257L/^281S	Herceptina-IgG1		11.26	3
P257L/G385H	Herceptina-IgG1		0.41	2
P257L/V279E	Herceptina-IgG1		3.01	3
P257L/V279Q	Herceptina-IgG1		12.4	3
P257L/V279Q/V284E	Herceptina-IgG1			0
P257L/V279Y	Herceptina-IgG1		0.75	1
P257L/V284E	Herceptina-IgG1		0.65	1
P257L/V308F	Herceptina-IgG1		6.68	4
P257L/V308Y	Herceptina-IgG1		3.5	3
P257L/Q311V	Herceptina-IgG1		23.3	3
P257L/G385N	Herceptina-IgG1		3.03	2
P257L/M428L	Herceptina-IgG1		3.73	1
P257L/N434Y	Herceptina-IgG1		835	3
P257M	Herceptina-IgG1		8.32	1
P257N	Herceptina-IgG1		2.56	8
P257N/V279E	Herceptina-IgG1		6	3
P257N/V279Q	Herceptina-IgG1		4.05	1
P257N/V279Q/V284E	Herceptina-IgG1			0
P257N/V279Y	Herceptina-IgG1		6.22	3
P257N/^281S	Herceptina-IgG1		5.99	3
P257N/V284E	Herceptina-IgG1		5.92	2
P257N/V284E/V308F	Herceptina-IgG1			0
P257N/G385H	Herceptina-IgG1		0.84	2
P257N/L306Y	Herceptina-IgG1		1.29	2
P257N/V308F	Herceptina-IgG1		0.88	4
P257N/V308Y	Herceptina-IgG1		48.2	1
P257Q	Herceptina-IgG1		0.25	2
P257Q/V279Q	Herceptina-IgG1		0.71	2
P257Q/V284E	Herceptina-IgG1			0

Figura 13c

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
P257R	Herceptina-IgG1		0.29	1
P257S	Herceptina-IgG1		1.94	2
P257T	Herceptina-IgG1		1.85	1
P257V	Herceptina-IgG1		1.9	1
P257W	Herceptina-IgG1		0.24	1
P257Y	Herceptina-IgG1		3.4	2
P257Y/V279Q	Herceptina-IgG1		1.78	2
P257Y/^281S	Herceptina-IgG1			0
P257Y/V308F	Herceptina-IgG1			0
E258R	Herceptina-IgG1		0.19	1
E258V	Herceptina-IgG1		0.22	1
V279A	Herceptina-IgG1		5.2	1
V279C	Herceptina-IgG1		3.93	1
V279D	Herceptina-IgG1		0.93	2
V279E	Herceptina-IgG1		0.47	5
V279E/G385H	Herceptina-IgG1		0.61	3
V279E/V284E	Herceptina-IgG1		3.91	2
V279F	Herceptina-IgG1			0
V279G	Herceptina-IgG1		1.27	1
V279H	Herceptina-IgG1			0
V279I	Herceptina-IgG1		15.12	1
V279K	Herceptina-IgG1			0
V279L	Herceptina-IgG1		0.3	1
V279M	Herceptina-IgG1		2.89	1
V279N	Herceptina-IgG1			0
V279P	Herceptina-IgG1		0.31	1
V279Q	Herceptina-IgG1		0.5	9
V279Q/V284E	Herceptina-IgG1		0.86	2
V279Q/L306Y	Herceptina-IgG1		3.93	3
V279Q/V308F	Herceptina-IgG1		4.6	3
V279Q/Q311V	Herceptina-IgG1			0
V279Q/G385H	Herceptina-IgG1		1.08	4
V279R	Herceptina-IgG1		1.11	1
V279S	Herceptina-IgG1		0.96	1
V279T	Herceptina-IgG1		0.75	3
V279W	Herceptina-IgG1		0.44	1
V279Y	Herceptina-IgG1		0.67	5

Figura 13d

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
V279Y/G385H	Herceptina-IgG1		0.58	3
V279Y/V284E	Herceptina-IgG1			0
V279Y/V308F	Herceptina-IgG1		1.59	4
D280E	Herceptina-IgG1		0.28	1
D280H	Herceptina-IgG1		0.53	2
^281A	Herceptina-IgG1			0
^281D	Herceptina-IgG1		0.89	3
^281S	Herceptina-IgG1		0.62	7
^281S/V284E	Herceptina-IgG1			0
^281S/V308F	Herceptina-IgG1		2.13	2
^281S/V308Y	Herceptina-IgG1		1.46	1
^281S/N434Y	Herceptina-IgG1		176.7	3
^281T	Herceptina-IgG1		0.56	1
V282D	Herceptina-IgG1		0.25	1
V282F	Herceptina-IgG1		0.42	1
V282H	Herceptina-IgG1		0.31	1
V282I	Herceptina-IgG1		0.36	1
V282T	Herceptina-IgG1		0.58	1
E283F	Herceptina-IgG1		0.79	3
E283F/V284E	Herceptina-IgG1		1.93	1
E283I	Herceptina-IgG1		1.15	2
E283L	Herceptina-IgG1		1.85	5
E283L/V284E	Herceptina-IgG1			0
E283Y	Herceptina-IgG1			0
V284D	Herceptina-IgG1			0
V284E	Herceptina-IgG1		0.68	10
V284E/G385H	Herceptina-IgG1		1.13	3
V284E/L306Y	Herceptina-IgG1		0.66	3
V284E/V308F	Herceptina-IgG1		3.96	3
V284E/V308Y	Herceptina-IgG1		0.22	1
V284H	Herceptina-IgG1			0
V284K	Herceptina-IgG1		0.15	1
V284P	Herceptina-IgG1			0
V284Q	Herceptina-IgG1		1.6	2
V284R	Herceptina-IgG1			0
V284S	Herceptina-IgG1		0.48	2
V284Y	Herceptina-IgG1		0.55	1
H285F	Herceptina-IgG1		0.98	1
H285S	Herceptina-IgG1		0.89	2
H285V	Herceptina-IgG1		0.74	2
deleteN286	Herceptina-IgG1		1.95	1
N286D	Herceptina-IgG1		10.18	1
N286L	Herceptina-IgG1		1.45	1

Figura 13e

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
A287H	Herceptina-IgG1		0.81	1
A287S	Herceptina-IgG1		1.27	2
A287V	Herceptina-IgG1		0.74	1
A287Y	Herceptina-IgG1		0.52	1
K288D	Herceptina-IgG1			0
K288H	Herceptina-IgG1		0.53	2
K288Q	Herceptina-IgG1		0.33	1
K288R	Herceptina-IgG1		0.27	3
K288S	Herceptina-IgG1		0.03	1
V305H	Herceptina-IgG1		0.51	1
V305T	Herceptina-IgG1		0.55	1
L306E	Herceptina-IgG1			0
L306F	Herceptina-IgG1		0.46	1
L306H	Herceptina-IgG1			0
L306I	Herceptina-IgG1		0.7	2
L306N	Herceptina-IgG1		0.91	1
L306T	Herceptina-IgG1		0.64	2
L306V	Herceptina-IgG1		0.34	1
L306Y	Herceptina-IgG1		1.18	6
T307D	Herceptina-IgG1		0.82	1
T307V	Herceptina-IgG1		0.57	3
T307Y	Herceptina-IgG1			0
V308A	Herceptina-IgG1		1.38	1
V308C	Herceptina-IgG1		2.84	1
V308D	Herceptina-IgG1		0.02	1
V308E	Herceptina-IgG1			0
V308F	Herceptina-IgG1		2.87	14
V308F	Herceptina-IgG1	S298A/E333A/K334A	36.04	1
V308F	Herceptina-IgG1	I332E	1.82	3
V308F	Herceptina-IgG1	S239D/I332E	1.91	3
V308F/Q311V	Herceptina-IgG1		11.73	1
V308F/G385H	Herceptina-IgG1		1.62	3
V308F/G385N	Herceptina-IgG1			0
V308F/M428L	Herceptina-IgG1		11.79	1
V308F/N434Y	Herceptina-IgG1		353.73	3

Figura 13f

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
V308G	Herceptina-IgG1		0.18	1
V308H	Herceptina-IgG1			0
V308I	Herceptina-IgG1		0.48	1
V308K	Herceptina-IgG1		0.53	1
V308L	Herceptina-IgG1		0.48	1
V308M	Herceptina-IgG1		0.45	1
V308N	Herceptina-IgG1		1.22	3
V308P	Herceptina-IgG1			0
V308Q	Herceptina-IgG1		0.58	1
V308R	Herceptina-IgG1		1.56	1
V308S	Herceptina-IgG1		0.15	1
V308T	Herceptina-IgG1		0.45	2
V308W	Herceptina-IgG1		9.57	1
V308Y	Herceptina-IgG1		4.25	4
V308Y/G385H	Herceptina-IgG1			0
L309F	Herceptina-IgG1		0.36	1
L309H	Herceptina-IgG1			0
L309I	Herceptina-IgG1		0.34	2
L309N	Herceptina-IgG1			0
L309P	Herceptina-IgG1			0
L309Q	Herceptina-IgG1		0.15	1
L309V	Herceptina-IgG1		0.59	3
L309Y	Herceptina-IgG1		0.2	1
H310K	Herceptina-IgG1		0.62	2
H310N	Herceptina-IgG1		0.39	1
H310T	Herceptina-IgG1		0.39	2
Q311A	Herceptina-IgG1		2.52	1
Q311H	Herceptina-IgG1		0.87	1
Q311L	Herceptina-IgG1		2.34	1
Q311S	Herceptina-IgG1			0
Q311T	Herceptina-IgG1		1.47	1
Q311V	Herceptina-IgG1		3.15	3
Q311W	Herceptina-IgG1		0.89	1
D312H	Herceptina-IgG1		0.38	1
W313Y	Herceptina-IgG1		0.48	1
N315E	Herceptina-IgG1		0.53	1
N315G	Herceptina-IgG1			0
N315H	Herceptina-IgG1		0.45	1
N315Q	Herceptina-IgG1		0.79	3
N315R	Herceptina-IgG1		0.48	1
N315S	Herceptina-IgG1		0.31	1
N315T	Herceptina-IgG1		1.72	1
K317H	Herceptina-IgG1		0.71	1
K317S	Herceptina-IgG1			0
A339P	Herceptina-IgG1			0

Figura 13g

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
K340P	Herceptina-IgG1		0.54	1
G341S	Herceptina-IgG1		0.77	1
P374H	Herceptina-IgG1			0
P374S	Herceptina-IgG1		0.59	1
D376H	Herceptina-IgG1		0.42	1
D376L	Herceptina-IgG1		0.49	1
A378H	Herceptina-IgG1		0.5	1
A378N	Herceptina-IgG1		0.58	1
E380T	Herceptina-IgG1			0
E380Y	Herceptina-IgG1		0.35	1
E382H	Herceptina-IgG1		0.43	3
S383H	Herceptina-IgG1		0.96	1
S383K	Herceptina-IgG1			0
S383Q	Herceptina-IgG1		0.9	1
N384E	Herceptina-IgG1		0.57	1
N384G	Herceptina-IgG1		0.38	1
N384H	Herceptina-IgG1		0.57	1
G385A	Herceptina-IgG1		0.27	1
G385C	Herceptina-IgG1		0.36	1
G385D	Herceptina-IgG1		0.54	1
G385E	Herceptina-IgG1		6.12	1
G385F	Herceptina-IgG1			0
G385H	Herceptina-IgG1		1.05	5
G385H	Herceptina-IgG1	I332E	1.37	3
G385H	Herceptina-IgG1	S239D/I332E	17.37	2
G385I	Herceptina-IgG1			0
G385K	Herceptina-IgG1		0.38	1
G385L	Herceptina-IgG1			0
G385M	Herceptina-IgG1			0
G385N	Herceptina-IgG1		2.94	2
G385P	Herceptina-IgG1			0
G385Q	Herceptina-IgG1			0
G385R	Herceptina-IgG1		0.11	1
G385S	Herceptina-IgG1		0.18	1
G385T	Herceptina-IgG1		0.16	1
G385V	Herceptina-IgG1		0.13	1
G385W	Herceptina-IgG1		0.08	1
G385Y	Herceptina-IgG1			0
Q386E	Herceptina-IgG1		0.85	1
Q386H	Herceptina-IgG1		0.68	1
Q386K	Herceptina-IgG1		0.06	1

Figure 13h

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
deleteP387	Herceptina-IgG1			0
P387A	Herceptina-IgG1		0.26	1
P387H	Herceptina-IgG1		1.04	1
P387K	Herceptina-IgG1		0.86	1
P387Q	Herceptina-IgG1		1.06	1
N389E	Herceptina-IgG1		0.78	1
N389H	Herceptina-IgG1		0.53	1
S426E	Herceptina-IgG1		0.6	1
S426H	Herceptina-IgG1		1.14	1
S426L	Herceptina-IgG1		1.3	1
S426N	Herceptina-IgG1		0.25	1
S426R	Herceptina-IgG1		1.47	1
S426V	Herceptina-IgG1		1.38	1
S426Y	Herceptina-IgG1		0.53	1
V427A	Herceptina-IgG1		0.81	1
V427I	Herceptina-IgG1		0.64	1
M428L	Herceptina-IgG1		2.92	5
H429D	Herceptina-IgG1		0.47	2
H429F	Herceptina-IgG1		0.13	1
H429K	Herceptina-IgG1			0
H429N	Herceptina-IgG1		0.5	2
H429Q	Herceptina-IgG1		1.4	1
H429S	Herceptina-IgG1		0.53	3
H429T	Herceptina-IgG1		0.66	3
H429Y	Herceptina-IgG1		0.13	1
E430D	Herceptina-IgG1		0.2	1
E430H	Herceptina-IgG1		0.35	1
E430K	Herceptina-IgG1			0
E430L	Herceptina-IgG1		0.5	1
E430Q	Herceptina-IgG1		0.26	1
E430Y	Herceptina-IgG1			0
A431G	Herceptina-IgG1		0.05	1
A431H	Herceptina-IgG1		0.45	3
A431I	Herceptina-IgG1		0.55	1
A431P	Herceptina-IgG1			0
A431S	Herceptina-IgG1		0.51	1
L432F	Herceptina-IgG1		0.39	1
L432H	Herceptina-IgG1			0
L432N	Herceptina-IgG1		0.45	1
L432S	Herceptina-IgG1		0.57	1
L432V	Herceptina-IgG1		0.73	3
H433E	Herceptina-IgG1			0
H433N	Herceptina-IgG1		0.19	1
H433P	Herceptina-IgG1		1.18	1
H433R	Herceptina-IgG1		0.88	1
H433S	Herceptina-IgG1			0



Figura 13j

Variante	Región variable-Fc	Mutaciones de Fondo	Media de Veces de Incremento	N
WT	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc v1		1.45	6
WT	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc			0
P257L	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc			0
V308F	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc			0
G385H	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc			0
WT	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
P257L	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
V308F	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
G385H	Herceptina - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
P257L	AC10 - IgG1			0
V308F	AC10 - IgG1			0
G385H	AC10 - IgG1			0
P257L	AC10 - IgG1	S239D/I332E		0
V308F	AC10 - IgG1	S239D/I332E		0
G385H	AC10 - IgG1	S239D/I332E		0
P257L	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc			0
V308F	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc			0
G385H	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc			0
P257L	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
V308F	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
G385H	AC10 - IgG1/2 Híbrido Fc	S239D/I332E		0
T250Q	AC10 - IgG1	S239D/I332E	0.59	1
V284D	AC10 - IgG1	S239D/I332E	0.88	1
V284E	AC10 - IgG1	S239D/I332E	0.17	1
M428L	AC10 - IgG1	S239D/I332E	1.82	1

Figura 14a

Mutaciones	Proporción de unión aFcRn Variante/WT
D221K	5.66
D221Y	2.74
K222Y	1.31
T223E	2.04
T223K	2.97
H224E	5.11
H224Y	1.68
T225E	4.89
T225K	5.68
T225W	6.89
P227E	1.49
P227G	1.67
P227K	1.45
P228G	1.77
P228K	1.55
P228Y	1.45
P230E	1.01
P230G	1.16
P232K	1.56
E233G	2.09
E233M	1.13
E233R	1.05
E233S	1.10
E233T	1.19
E233W	1.64
E233Y	1.86
L234D	1.54
L234E	1.25
L234F	1.46
L234G	2.54
L234H	1.48
L234I	1.26
L234I/L235D	1.03
L234N	1.06
L234R	1.19
L234V	1.45
L234Y	1.90
L235N	1.32
L235Q	1.67
L235S	1.51
L235T	1.65
L235V	1.31
L235Y	1.02
G236A	1.75
G236D	1.53

G236A	1.75
G236D	1.53
G236E	1.46
G236F	1.75
G236H	1.48
G236I	1.33
G236K	1.38
G236M	1.60
G236N	1.89
G236P	1.41
G236Q	1.46
G236R	1.99
G236S	1.77
G236T	1.56
G236V	1.35
G236W	1.52
G236Y	1.52
G237D	1.84
G237E	1.36
G237H	1.48
G237I	1.01
G237K	1.47
G237L	5.91
G237M	73.39
G237N	1.39
G237P	2.80
G237Q	1.39
G237R	1.36
G237S	1.29
G237T	1.32
G237W	1.20
G237Y	1.92
P238D	1.03
P238E	3.71
P238F	2.41
P238G	1.53
P238H	1.46
P238I	1.44
P238K	5.01
P238L	1.71
P238M	2.33
P238N	1.15
P238S	1.12
P238T	1.12
P238V	1.43
P238W	1.30

Figura 14b

P238W	1.30
S239D	1.73
S239D/D265H/N297 D/I332E	1.26
S239D/D265I/N297D /I332E	
S239D/E272I/I332E	1.81
S239D/E272S/I332E	1.49
S239D/E272Y/I332E	1.31
S239D/I332D	1.12
S239D/I332E	1.22
S239D/K326T/I332E	2.22
S239D/N297D/I332E	3.09
S239E	1.47
S239E/I332E	1.34
S239E/N297D/I332E	
S239E/V264I/A330Y/ I332E	2.36
S239E/V264I/I332E	2.71
S239E/V264I/S298A/ A330Y/I332E	10.14
S239G	1.16
S239L	4.60
S239M	1.03
S239Q/I332E	1.33
S239Q/I332N	1.11
S239Q/I332Q	1.04
S239Q/V264I/I332E	
S239R	1.04
S239T	1.12
S239V	1.17
S239Y	
V240I	1.28
V240M	2.50
V240T	2.61
F241E	1.09
F241L	1.99
F241L/V262I	1.37
F241W	1.70
F241W/F243W/V262 A/V264A	1.91
F241Y/F243Y/V262T /V264T	1.89
F241Y/F243Y/V262T /V264T	1.89
F243E	1.14
F243L/V262I/V264W	1.35
F243W	4.63
K246H	4.02
K246Y	2.47
D249Q	2.06
D249Y	2.57
R255E	1.16
R255Y	12.88
E258Y	1.07
T260D	1.71
T260E	5.49
T260H	7.30
T260Y	7.51
V262E	9.27
V263I	2.71
V264A	1.12
V264D	7.67
V264F	1.07
V264I	1.32
V264I/A330L/I332E	1.13
V264I/I332E	1.70
V264N	3.39
V264S	5.13
V264T	1.66
D265F/N297E/I332E	1.38
D265G	1.74
D265P	1.18
D265R	1.16
V266I	1.17
S267E	2.24
S267K	1.70
S267L/A327S	1.05
H268E	1.71
H268M	1.88
E269F	1.51
E269G	1.34
E269I	1.26
E269K	1.23
E269M	1.11
E269P	1.23
E269S	1.31
E269V	1.38
E269W	1.19
E269Y	24.75

Figura 14c

E269Y	24.75
D270I	1.23
D270S	1.03
P271A	1.01
P271I	1.99
P271S	1.14
P271T	3.88
P271V	1.06
P271Y	1.48
E272D	1.37
E272H	1.45
E272I	1.05
E272L	1.81
E272P	2.17
E272R	1.83
E272T	2.46
E272V	1.77
E272W	1.82
E272Y	2.08
K274E	1.05
K274F	1.02
K274G	1.04
K274I	1.08
K274M	1.01
K274N	1.26
K274T	1.08
N276D	1.18
N276F	1.18
N276H	1.19
N276L	1.21
N276R	1.19
N276V	1.27
N276W	2.00
Y278D	1.79
Y278I	1.52
Y278L	1.74
Y278M	1.28
Y278N	1.33
Y278R	1.23
Y278S	1.23
Y278V	1.27
G281D	1.33
G281Y	1.46
V282E	1.91

V282E	1.91
V282G	1.16
V282K	1.44
V282Y	1.92
E283H	6.25
E283K	2.74
E283L	9.25
E283P	1.33
E283R	1.86
E283Y	1.42
V284E	25.76
V284L	1.51
V284T	1.15
H285D	2.40
H285E	1.93
H285K	1.76
H285Q	1.38
H285W	1.33
H285Y	1.25
N286E	2.12
N286P	2.90
N286Y	1.45
K288Y	1.10
P291H	2.56
P291I	1.15
P291Q	1.24
R292D	1.67
R292E	1.45
R292Y	1.36
E294G	1.25
E294I	1.09
E294K	1.16
Q295T	3.82
Q295V	1.19
Y296E	1.23
Y296I	1.71
Y296L	2.78
Y296S	
S298E	1.54
S298F	1.15
S298H	3.99
S298T	2.13
T299F	1.86
T299H	2.03
T299W	1.09
T299Y	3.85

Figura 14d

T299Y	3.85
Y300A	1.04
Y300E	1.27
Y300G	1.07
Y300K	1.01
Y300M	1.10
Y300N	1.14
Y300Q	1.11
Y300V	1.09
R301E	2.92
V302I	2.44
V303E	1.63
V303Y	1.15
S304N	1.19
S304T	2.86
E318L	3.61
E318R	1.17
E318Y	6.14
K320H	1.13
K320L	1.07
K320N	2.01
K320W	1.11
S324D	1.27
S324G	2.74
S324T	1.07
N325D	1.45
N325F	1.22
N325M	1.43
N325T	
N325V	
A327D	1.01
A327H	1.29
A327K	1.01
A327L	1.55
A327M	1.08
A327Y	1.23
L328A	1.32
L328D/I332E	11.84
L328E/I332E	1.44
L328F	2.06
L328G	1.16
L328H/I332E	1.16
L328I/I332E	2.21
L328N/I332E	1.18
L328Q/I332E	4.29
L328R	1.82
L328R	1.82
L328W	1.35
P329K	1.27
P329R	1.64
P329W	3.16
A330F	25.29
A330G	1.01
A330H	9.87
A330I	
A330L/I332E	1.50
A330P	5.48
A330R	
A330V	1.78
A330W	1.02
A330Y/I332E	1.53
P331F	3.91
P331L	1.77
P331Y	6.06
I332D	1.75
I332E	1.32
I332H	1.24
I332N	3.20
I332Q	1.20
I332T	1.02
I332V	59.27
I332Y	1.43
E333F	1.96
E333L	1.03
E333M	5.46
T335F	1.19
T335H	1.16
T335I	1.41
T335L	1.50
T335M	1.35
T335N	1.23
T335P	1.45
T335S	1.42
T335V	1.25
T335W	1.35
I336E	8.11
I336K	12.12

Figura 15

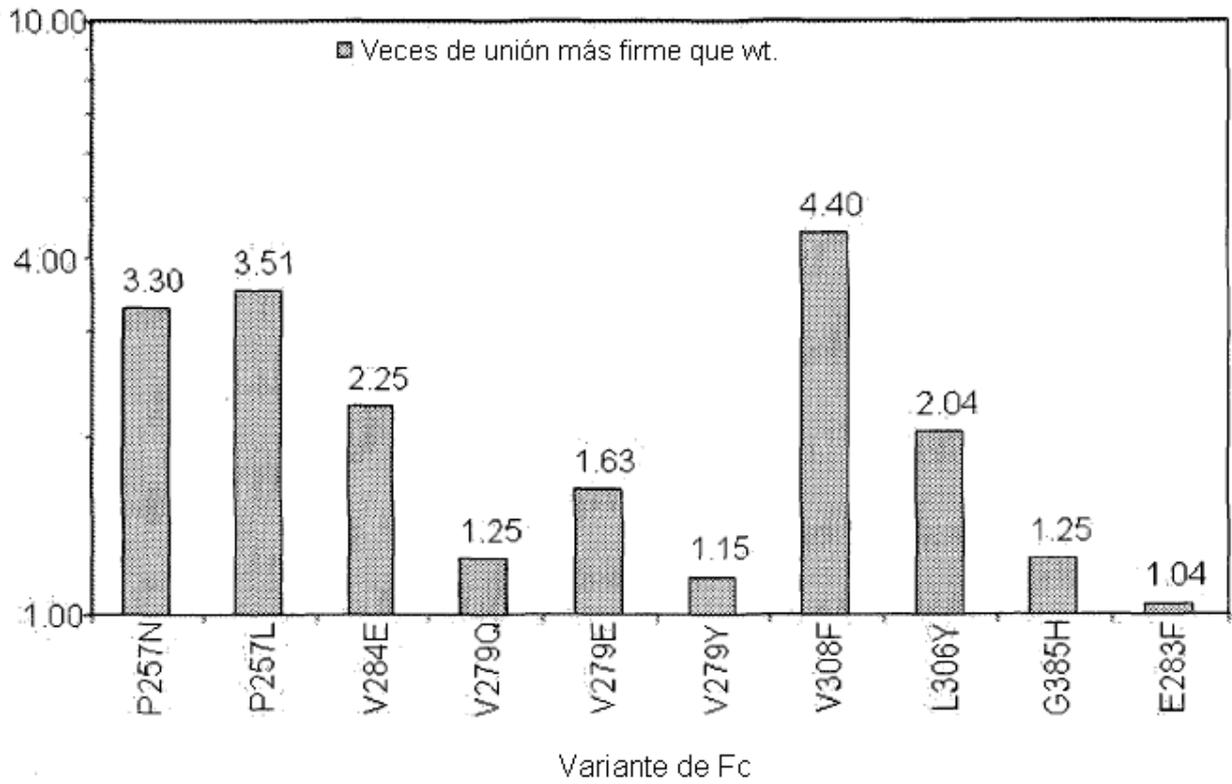


Figura 16a

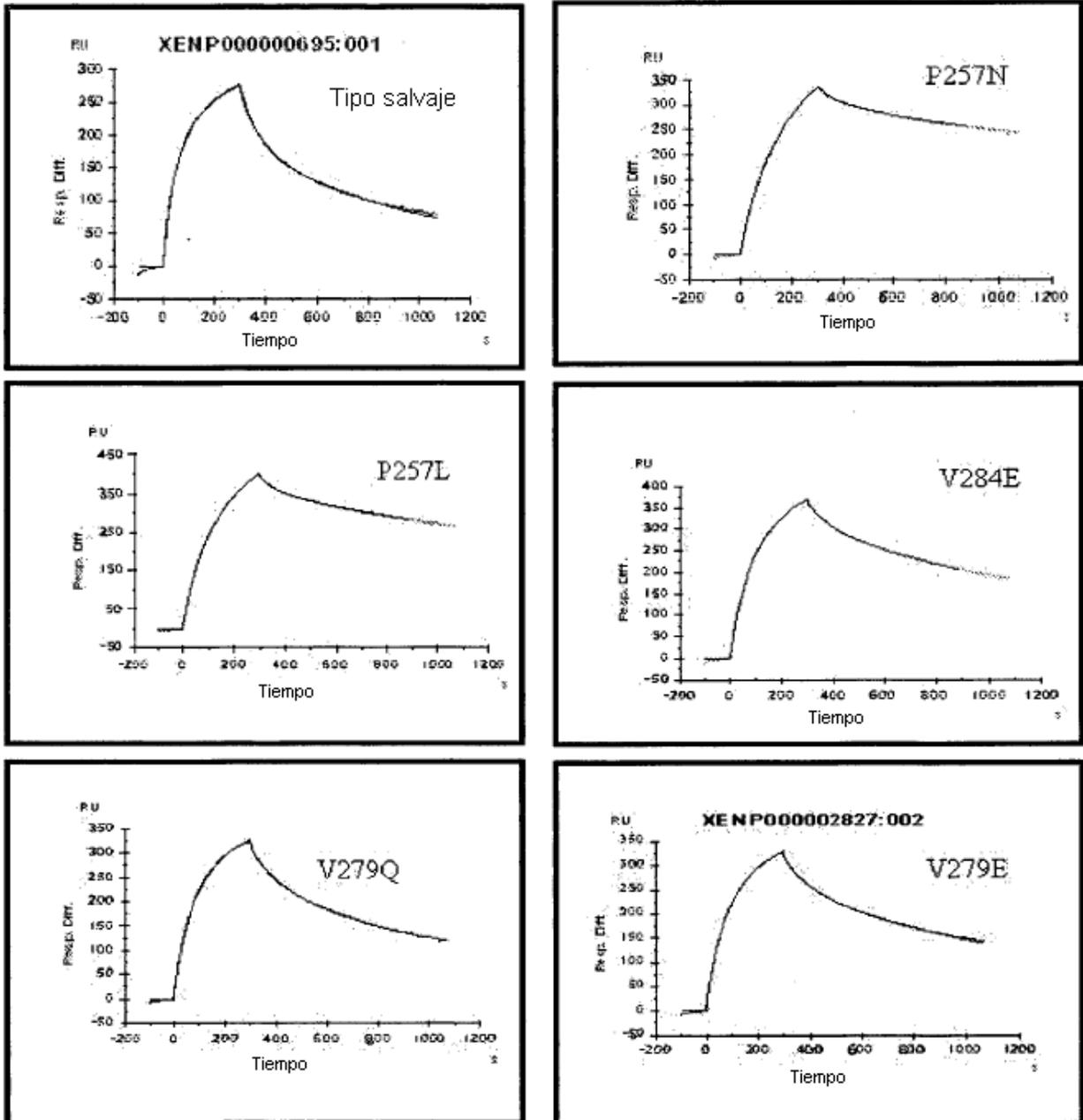


Figura 16b

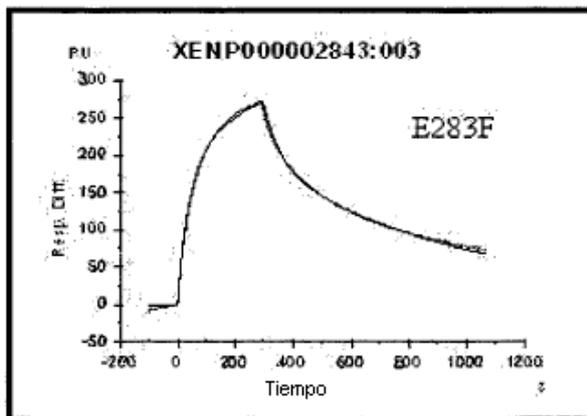
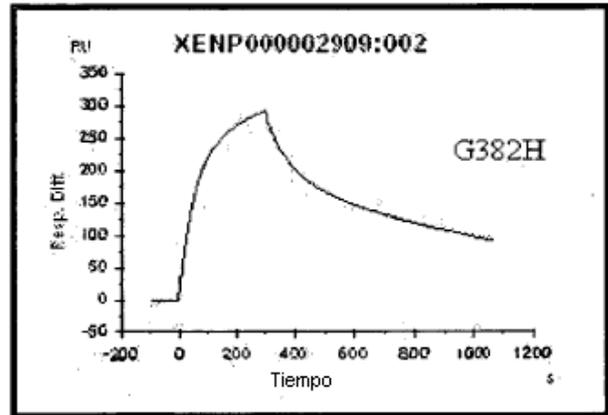
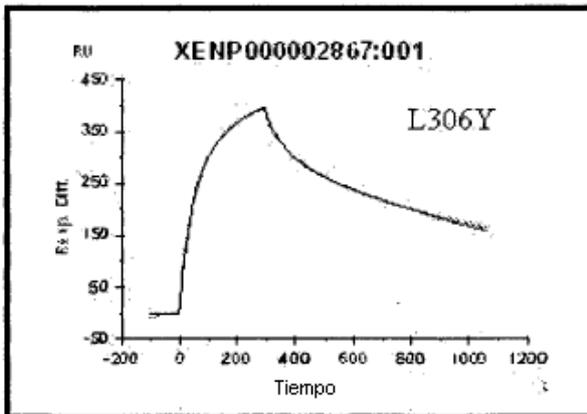
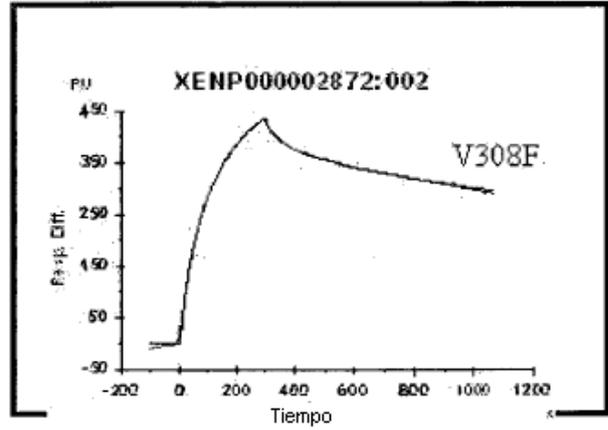
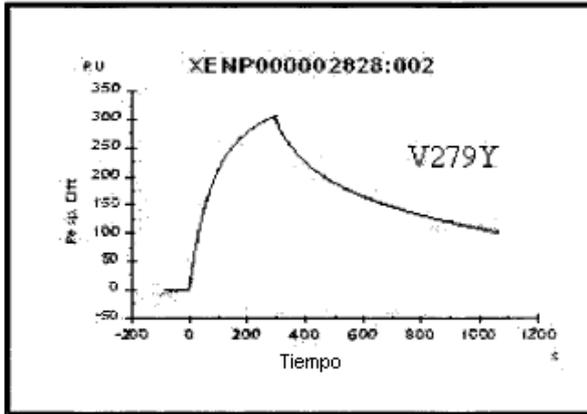


Figura 17a

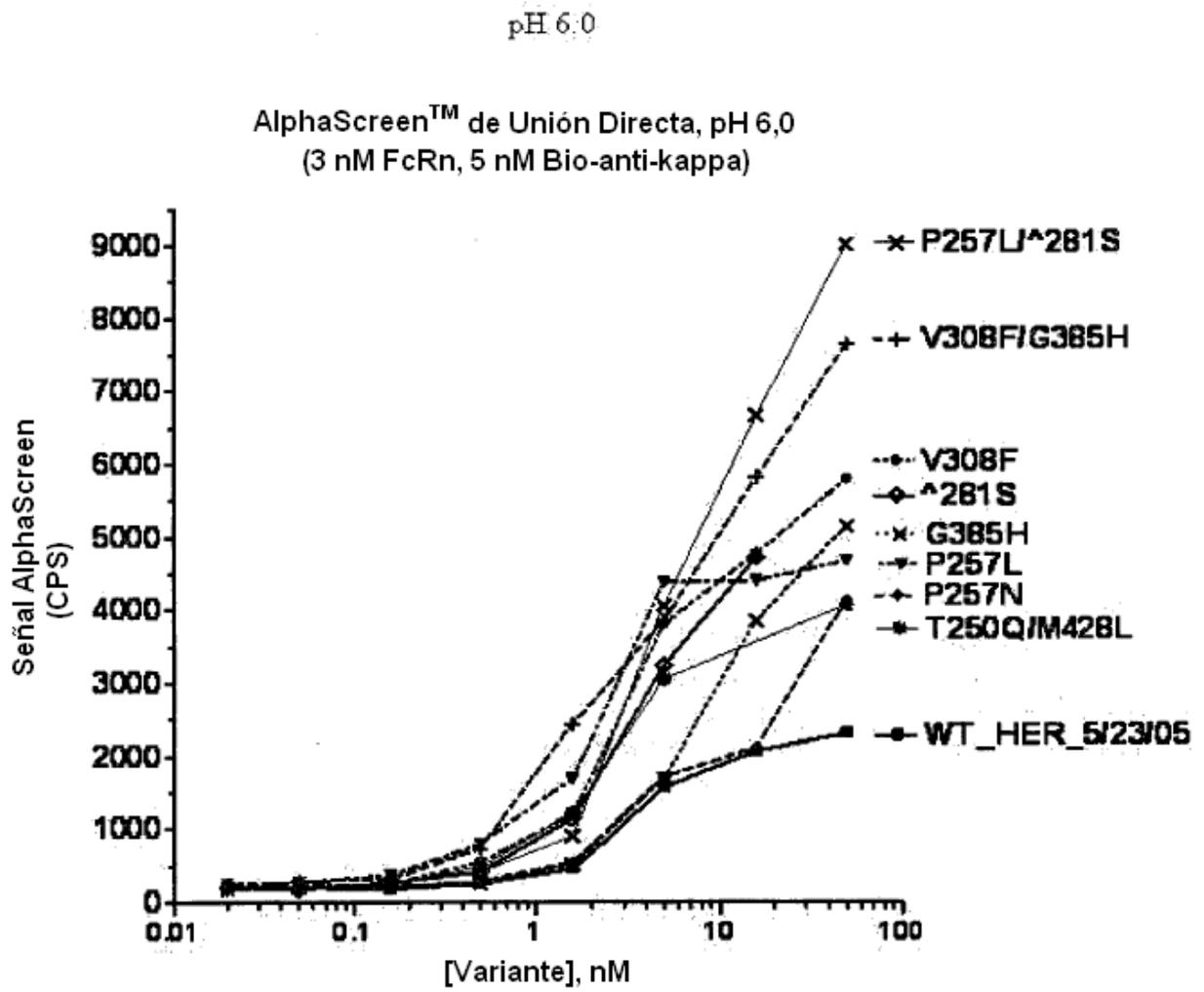


Figura 17b

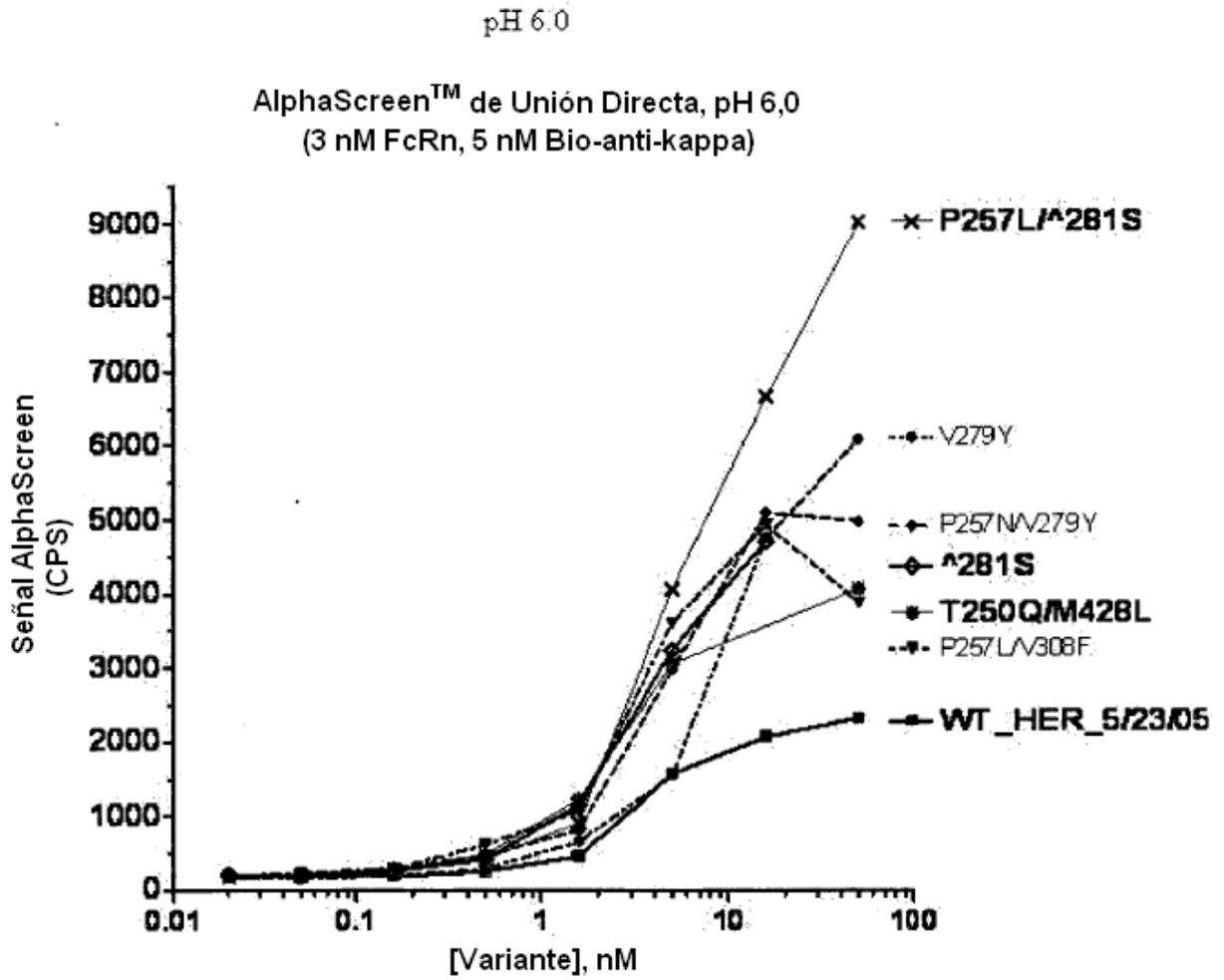


Figura 17c

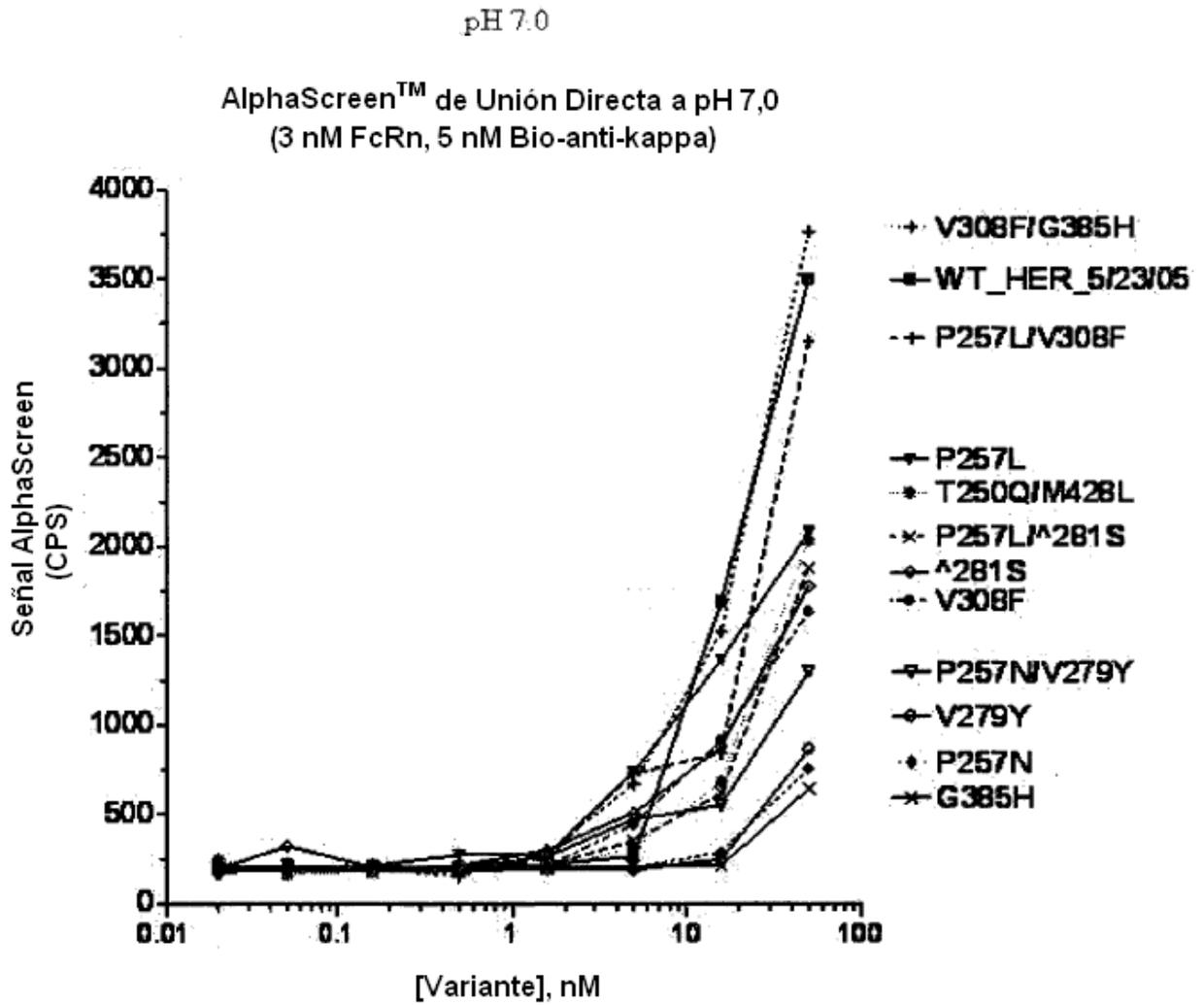
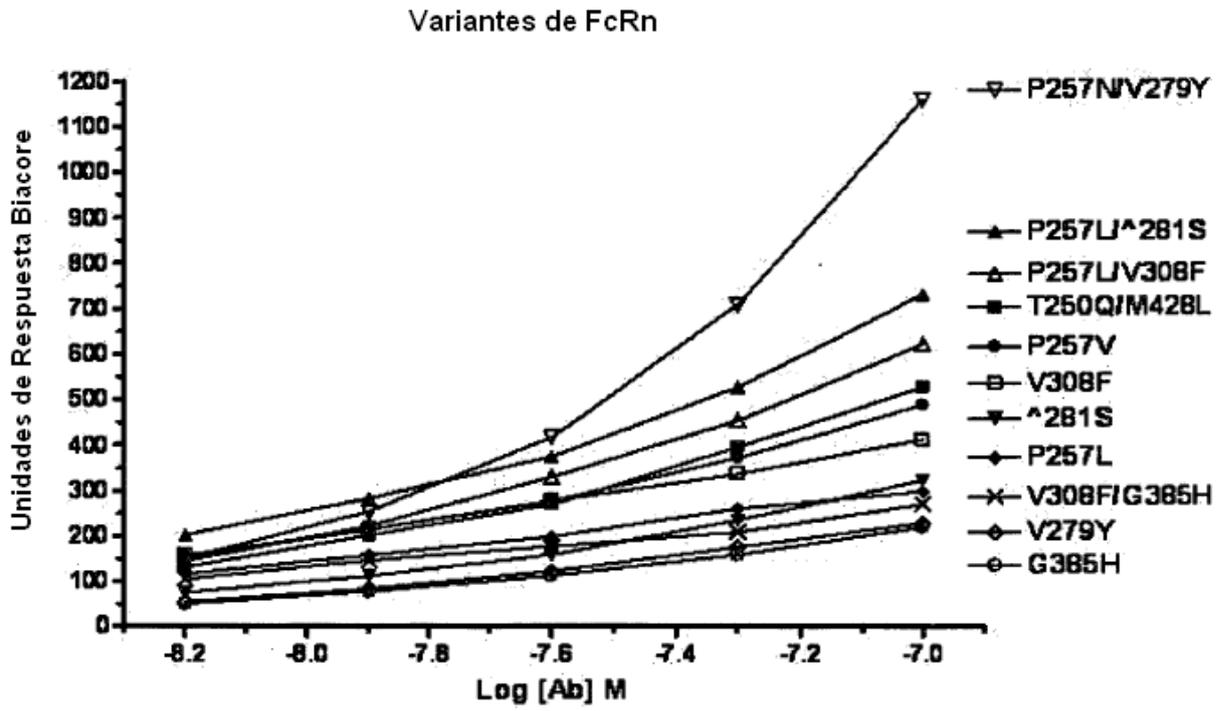
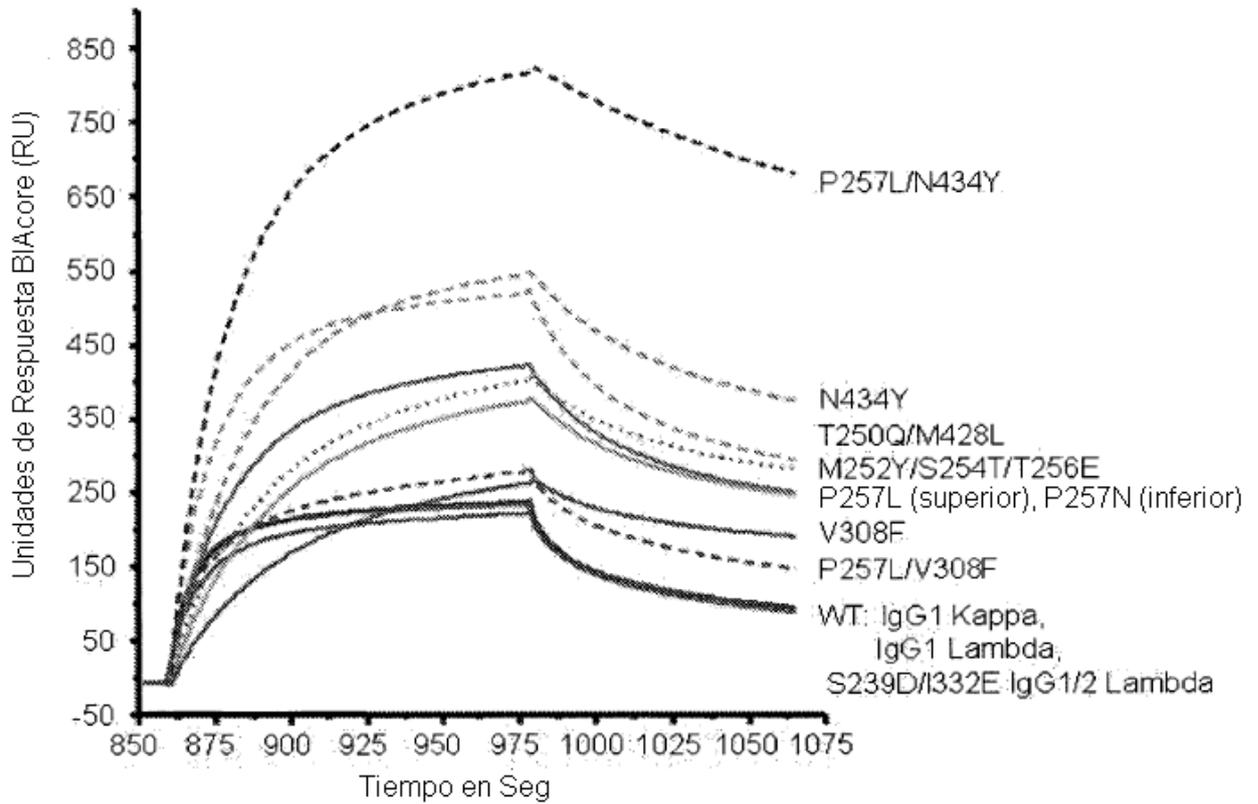


Figura 18



**Figura 19**

Unión de Variantes de OST577 a FcRn humano  
 BIAcore, 24 abr 2006, 100 nM [variante]



**Figura 20**

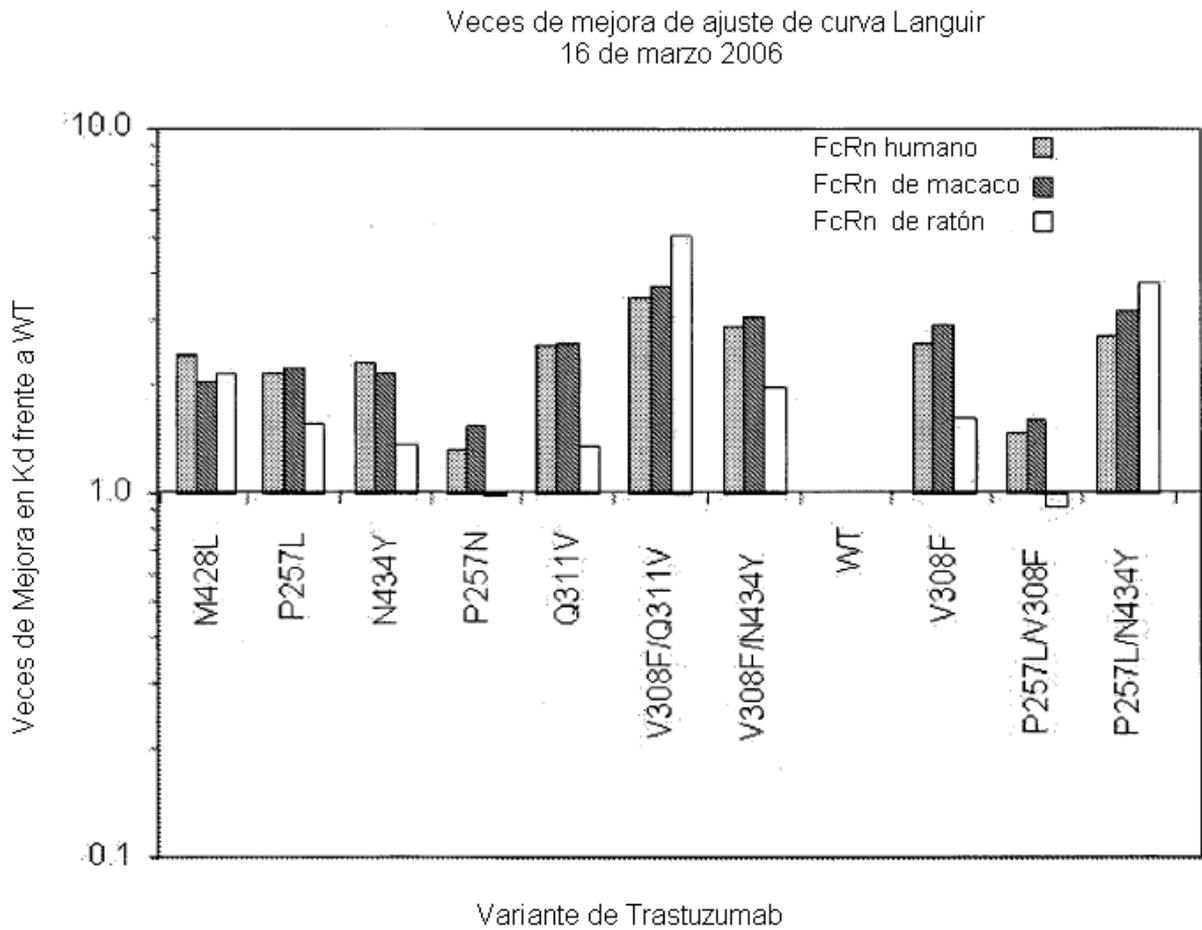


Figura 21a

Variante de FcRn	Anticuerpo	Variaciones	Veces Incremento	N
		Adicionales	Unión a FcRn	
L251Y	Herceptina-IgG1		0.9	1
M252Y	Herceptina-IgG1		9.6	1
S254T	Herceptina-IgG1		0.2	1
R255H	Herceptina-IgG1		0.8	1
T256E	Herceptina-IgG1		2.3	2
P257C	Herceptina-IgG1		21.0	3
P257L	Herceptina-IgG1		2.9	3
P257L	Herceptina-IgG1	I332E	5.2	1
P257L/V279Q	Herceptina-IgG1		3.9	1
P257L/V308F	Herceptina-IgG1		2.5	2
P257L/Q311V	Herceptina-IgG1		7.1	1
P257L/M428L	Herceptina-IgG1		4.6	1
P257L/N434Y	Herceptina-IgG1		307.7	3
P257M	Herceptina-IgG1		3.7	2
P257N	Herceptina-IgG1		1.6	2
P257N/V308F	Herceptina-IgG1		0.5	1
V279A	Herceptina-IgG1		1.4	1
V279E	Herceptina-IgG1		2.4	1
V279I	Herceptina-IgG1		1.1	1
V279Q	Herceptina-IgG1		1.6	2
V279Y	Herceptina-IgG1		2.7	1
A281S	Herceptina-IgG1		2.5	2
A281S/N434Y	Herceptina-IgG1		190.4	1
V284E	Herceptina-IgG1		2.3	1
deleteN286	Herceptina-IgG1		0.9	1
T307V	Herceptina-IgG1		2.6	1
V308F	Herceptina-IgG1		10.5	6
V308F	Herceptina-IgG1	I332E	4.7	1
V308F	Herceptina-IgG1	S239D/I332E	0.5	2
V308F/N434Y	Herceptina-IgG1		7.5	3
V308W	Herceptina-IgG1		13.4	2
V308Y	Herceptina-IgG1		2.4	2
L309V	Herceptina-IgG1		0.9	1
Q311A	Herceptina-IgG1		2.9	1
Q311L	Herceptina-IgG1		1.6	1
Q311V	Herceptina-IgG1		1.1	2

Figura 21b

Variante de FcRn	Anticuerpo	Variaciones	Veces Incremento	N
		Adicionales	Unión a FcRn	
Q311A	Herceptina-IgG1		2.9	1
Q311L	Herceptina-IgG1		1.6	1
Q311V	Herceptina-IgG1		1.1	2
G385H	Herceptina-IgG1		1.0	2
G385H	Herceptina-IgG1	I332E	1.5	1
G385H	Herceptina-IgG1	S239D/I332E	2.3	1
P387H	Herceptina-IgG1		1.7	1
S426R	Herceptina-IgG1		1.8	1
M428L	Herceptina-IgG1		6.5	1
H429Q	Herceptina-IgG1		1.6	1
H433R	Herceptina-IgG1		2.0	1
N434A	Herceptina-IgG1		1.9	1
N434H	Herceptina-IgG1		9.5	1
N434Y	Herceptina-IgG1		8.2	3
Y436H	Herceptina-IgG1		0.5	1
P257L	Herceptina - Híbrido		5.2	2
V308F	Herceptina - Híbrido		27.5	2
G385H	Herceptina - Híbrido		12.4	1
P257L	Herceptina - Híbrido	S239D/I332E	0.1	1
V308F	Herceptina - Híbrido	S239D/I332E	0.1	1
G385H	Herceptina - Híbrido	S239D/I332E	10.2	1
P257L	AC10 - IgG1		44.0	1
V308F	AC10 - IgG1		46.1	1
G385H	AC10 - IgG1		1.3	1
P257L	AC10 - IgG1	S239D/I332E	1.7	1
G385H	AC10 - IgG1	S239D/I332E	2.4	1
V308F	AC10 - Híbrido		41.9	1
G385H	AC10 - Híbrido		19.5	1
G385H	AC10 - Híbrido	S239D/I332E	6.3	1

## Figura 22

>Trastuzumab Cadena pesada (SEQ ID No. 11)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT  
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  
MDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH  
EALHNHYTQKSLSLSPGK

>Trastuzumab cadena ligera (SEQ ID No. 12)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY  
SGVPSRFSGSRSGTDFLTITISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE  
QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Figura 23**

>WT IgG1 (SEQ ID No. 13)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

>P257L IgG1 (SEQ ID No. 14)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTLEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

>P257N IgG1 (SEQ ID No. 15)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTNEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

>V308F IgG1 (SEQ ID No. 16)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
K

>Q311V IgG1 (SEQ ID No. 17)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHVDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

>G385H IgG1 (SEQ ID No. 18)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNHQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

## Figura 24

>WT híbrido (SEQ ID No. 19)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

>P257L Híbrido (SEQ ID No. 20)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTLEVTVCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

>P257N Híbrido (SEQ ID No. 21)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTNEVTVCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWL  
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE  
WESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL  
PGK

>V308F Híbrido (SEQ ID No. 22)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTFFVHQQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

>Q311V Híbrido (SEQ ID No. 23)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHVVDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

>G385H Híbrido (SEQ ID No. 24)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLN  
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW  
ESNHQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

Figura 25

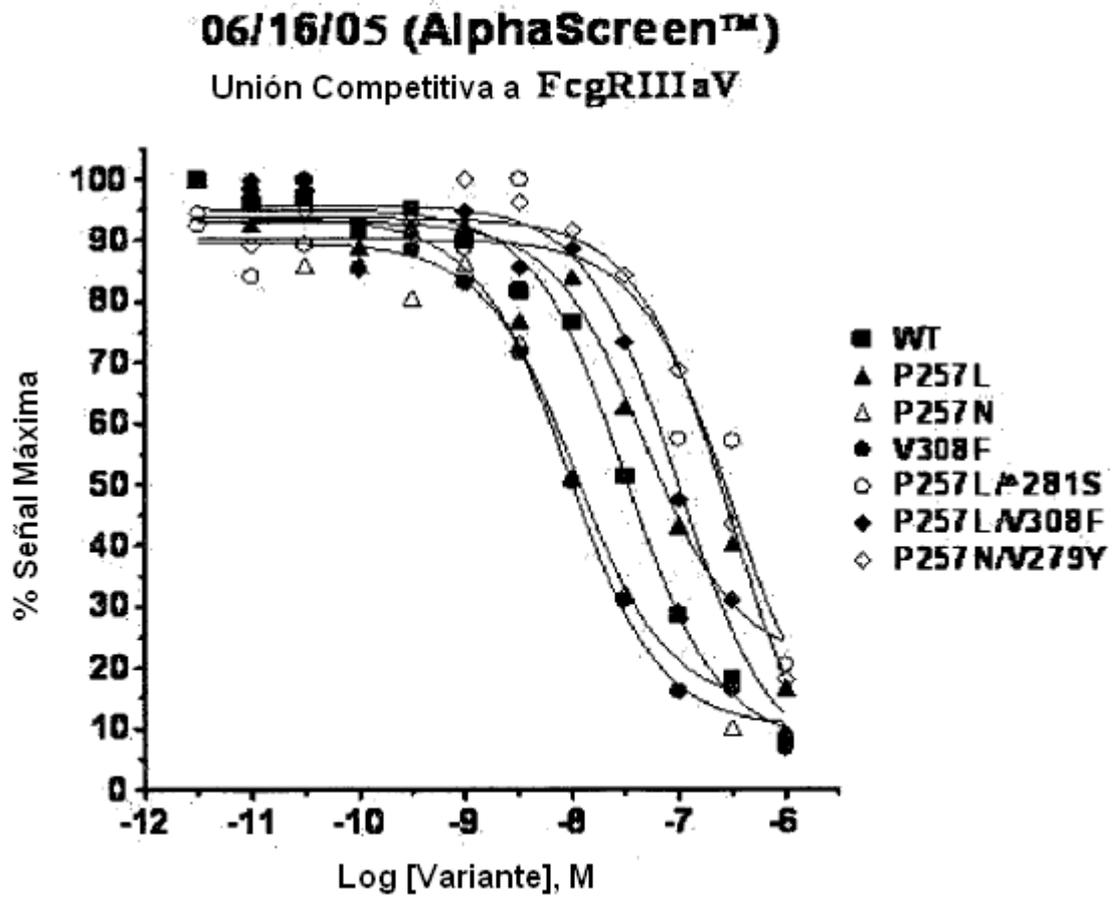


Figura 26

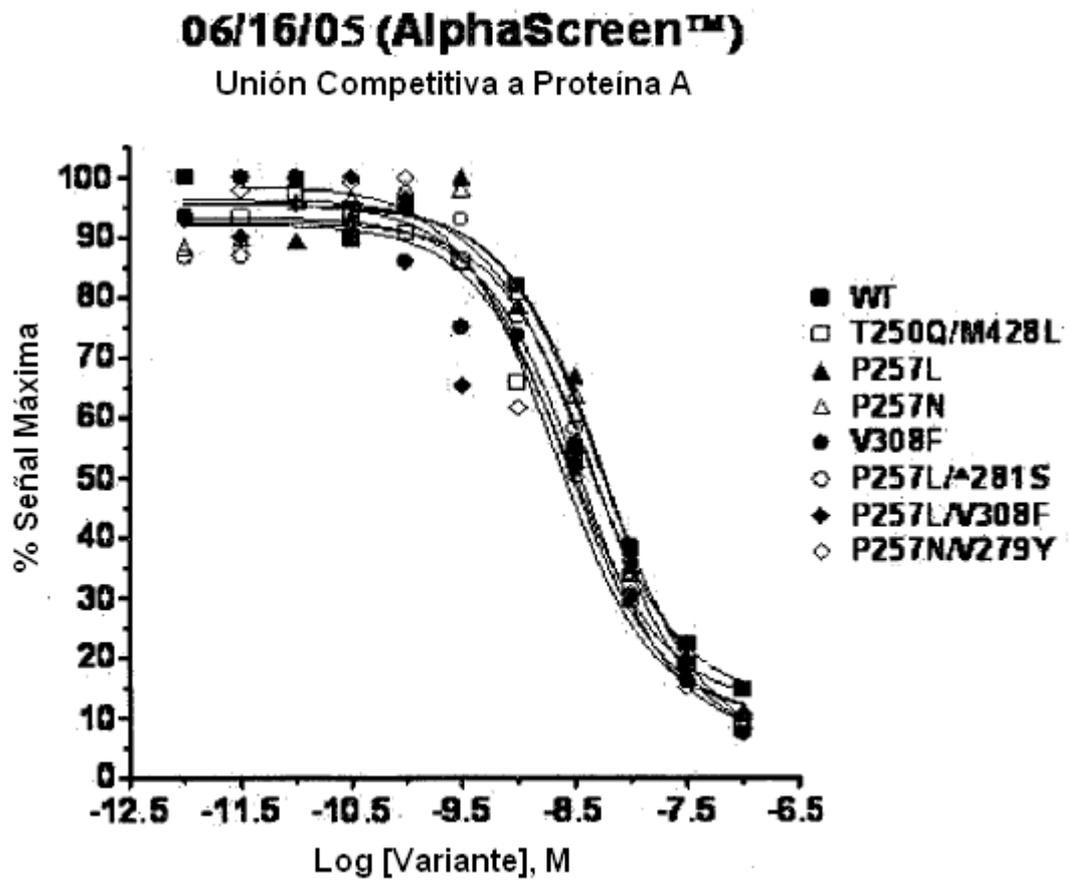
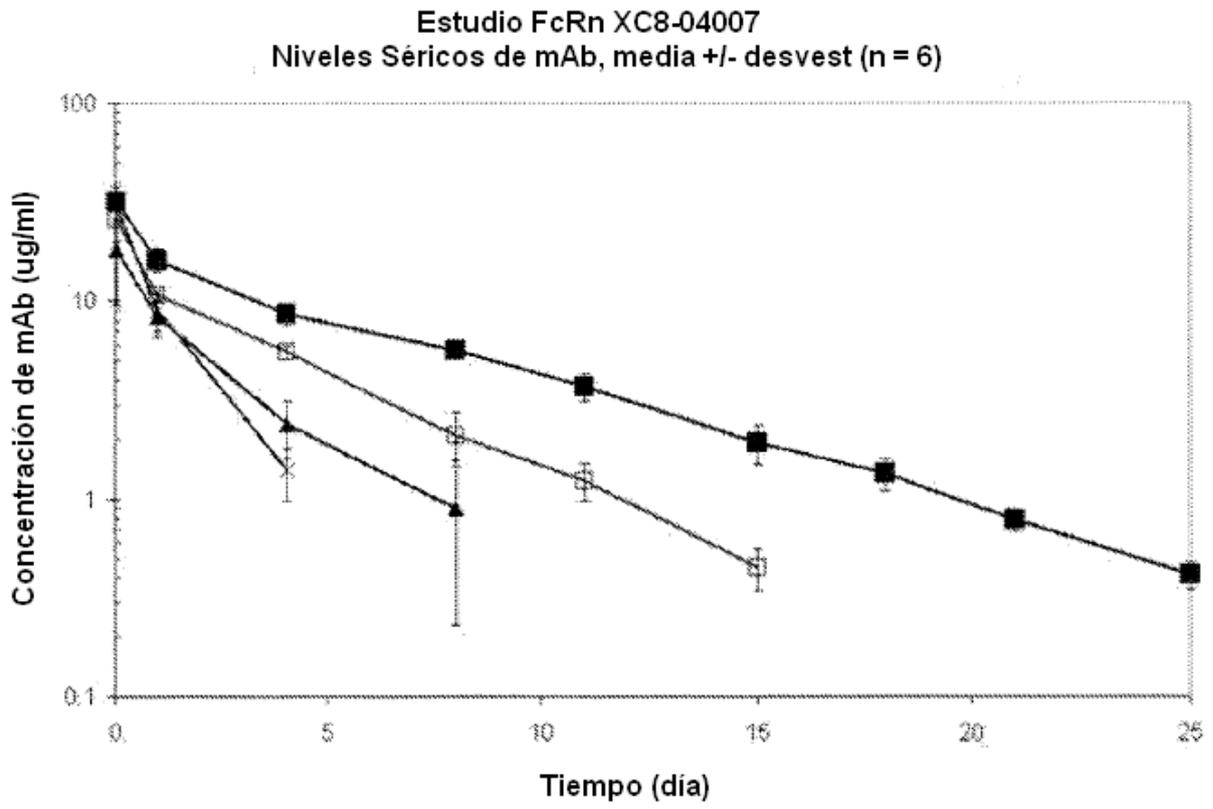


Figura 27



**Figura 28**

Anticuerpo producido	Vol Cultivo	Rendimiento anticuerpo
	ml	mg
Anti-VEGF IgG1 V308W	100	0.002
Anti-VEGF IgG1 M428L	100	0.16
Anti-VEGF IgG1 N434S	100	0.23
Anti-VEGF IgG1 P245G/V308F	100	0.00
Anti-VEGF IgG1 T250V/V308F	100	0.32
Anti-VEGF IgG1 T250I/V308F	100	0.23
Anti-VEGF IgG1 S254T/V308F	100	0.16
Anti-VEGF IgG1 T256V/V308F	100	0.18
Anti-VEGF IgG1 Y259I/V308F	100	0.18
Anti-VEGF IgG1 L306Y/V308F	100	0.034
Anti-VEGF IgG1 L306G/V308F	100	
Anti-VEGF IgG1 T307I/V308F	100	
Anti-VEGF IgG1 T307P/V308F	100	0.20
Anti-VEGF IgG1 T307Q/V308F	100	0.29
Anti-VEGF IgG1 T307V/V308F	100	0.007
Anti-VEGF IgG1 T307S/V308F	100	0.28
Anti-VEGF IgG1 V308F/L309Y	100	0.08
Anti-VEGF IgG1 V308F/L309N	100	0.32
Anti-VEGF IgG1 WT	100	0.86
Anti-VEGF IgG1 V308F	100	0.39
Anti-VEGF IgG1 T250Q/M428L	100	0.58
Anti-VEGF IgG1 G236R/L328R	100	0.74
Anti-VEGF IgG1 N434A	100	0.38
Anti-VEGF IgG1 V308Y	100	0.006
Anti-VEGF Hybrid S239D/I332E	100	0.33
Anti-VEGF IgG1 V308F/Q311P	100	0.068
Anti-VEGF IgG1 V308F/Y319L	100	0.029
Anti-VEGF IgG1 V308F/Y319F	100	0.52
Anti-VEGF IgG1 V308F/M428L	100	0.17
Anti-VEGF IgG1 M252Q/V308F	100	0.25

Figura 29

Veces de incremento en la unión a FcRn pH 6,0.

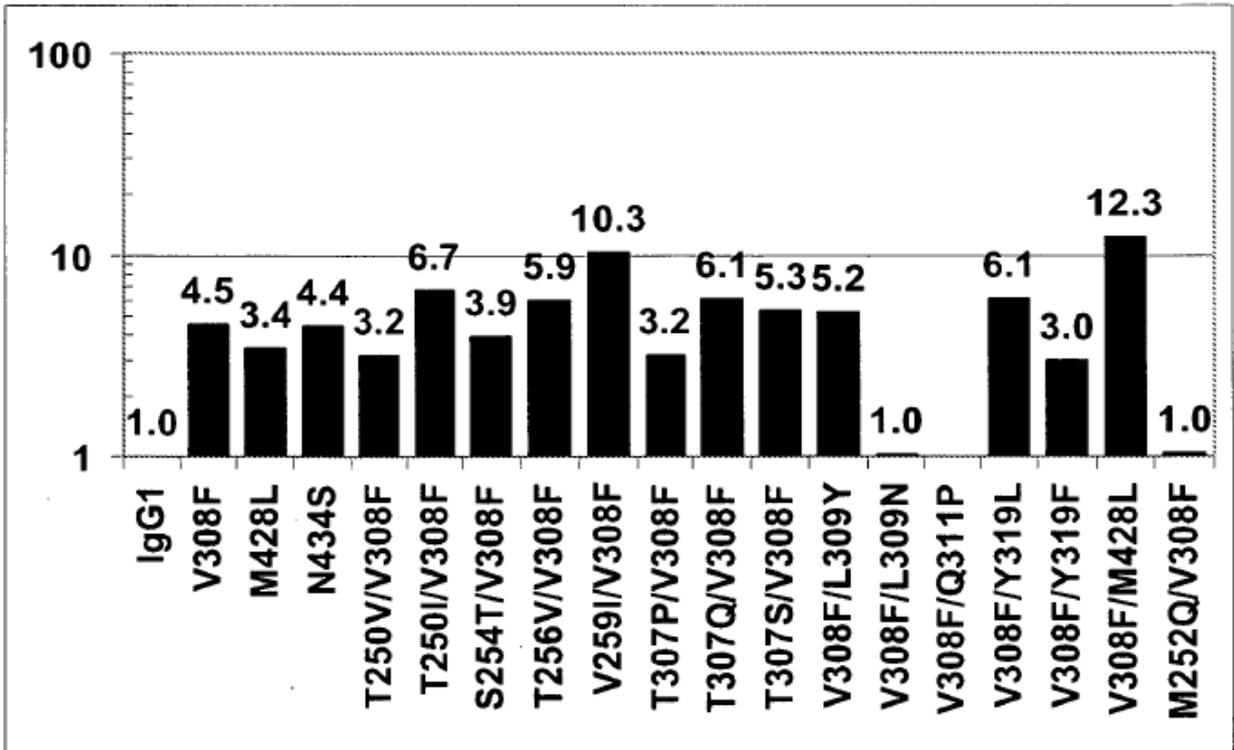
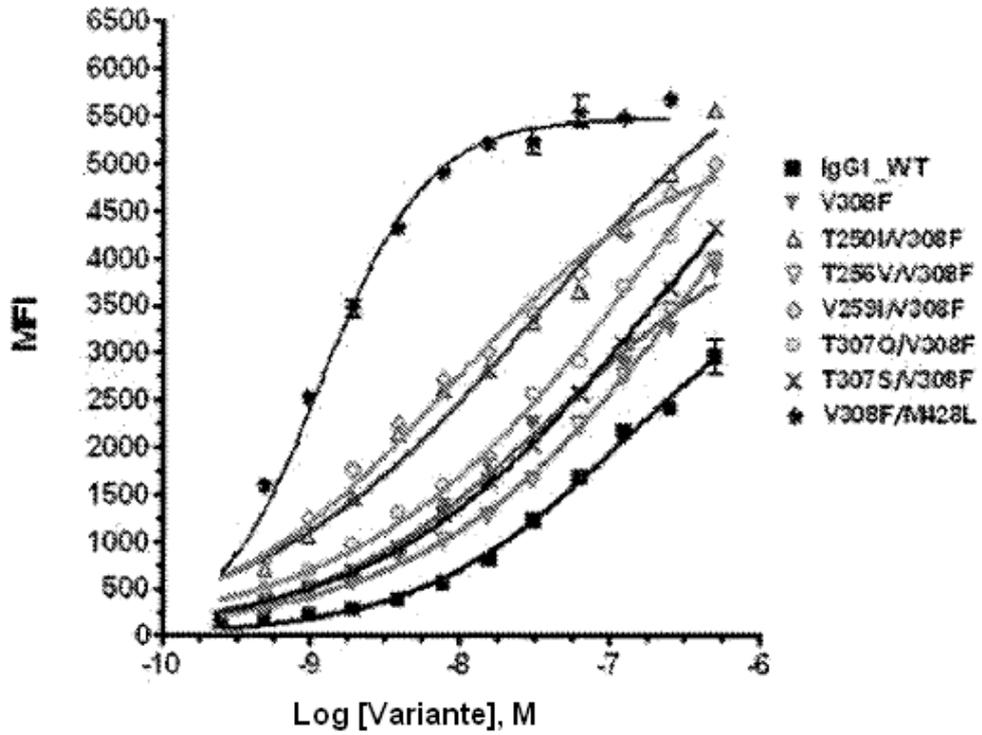
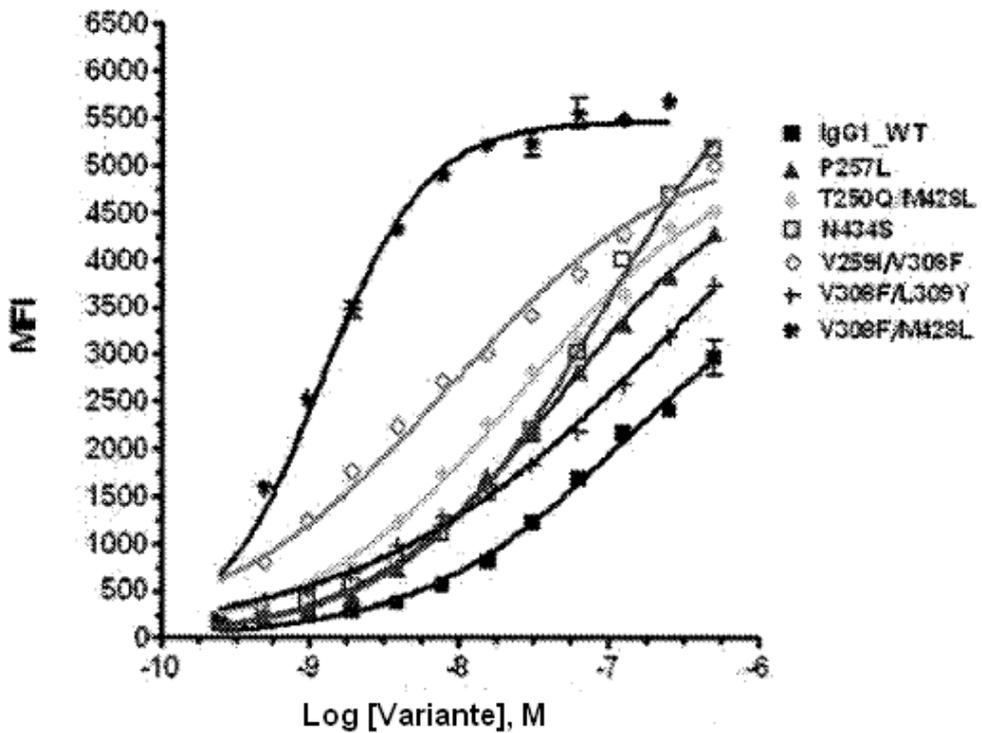


Figura 30

Unión a FcRn en la Superficie Celular de Variantes de Fc



Unión a FcRn en la Superficie Celular de Variantes de Fc



**Figura 31a**250Q

250Q/252Y,	250Q/256E,	250Q/286D,	250Q/308F,	250Q/308Y,
250Q/311A,	250Q/311V,	250Q/380A,	250Q/428L,	250Q/428F,
250Q/434H,	250Q/434F,	250Q/434Y,	250Q/434A,	250Q/434M,
250Q/434S				

250E

250E/252Y,	250E/256E,	250E/286D,	250E/308F,	250E/308Y,
250E/311A,	250E/311V,	250E/380A,	250E/428L,	250E/428F,
250E/434H,	250E/434F,	250E/434Y,	250E/434A,	250E/434M,
250E/434S				

252Y

252Y/250Q,	252Y/250E,	252Y/256E,	252Y/286D,	252Y/308F,
252Y/308Y,	252Y/311A,	252Y/311V,	252Y/380A,	252Y/428L,
252Y/428F,	252Y/434H,	252Y/434F,	252Y/434Y,	252Y/434A,
252Y/434M,	252Y/434S			

256E

256E/250Q,	256E/250E,	256E/252Y,	256E/286D,	256E/308F,
256E/308Y,	256E/311A,	256E/311V,	256E/380A,	256E/428L,
256E/428F,	256E/434H,	256E/434F,	256E/434Y,	256E/434A,
256E/434M,	256E/434S			

286D

286D/250Q,	286D/250E,	286D/252Y,	286D/256E,	286D/308F,
286D/308Y,	286D/311A,	286D/311V,	286D/380A,	286D/428L,
286D/428F,	286D/434H,	286D/434F,	286D/434Y,	286D/434A,
286D/434M,	286D/434S			

308F

308F/250Q,	308F/250E,	308F/252Y,	308F/256E,	308F/286D,
308F/311A,	308F/311V,	308F/380A,	308F/428L,	308F/428F,
308F/434H,	308F/434F,	308F/434Y,	308F/434A,	308F/434M,
308F/434S				

308Y

308Y/250Q,	308Y/250E,	308Y/252Y,	308Y/256E,	308Y/286D,
308Y/311A,	308Y/311V,	308Y/380A,	308Y/428L,	308Y/428F,
308Y/434H,	308Y/434F,	308Y/434Y,	308Y/434A,	308Y/434M,
308Y/434S				

311A

311A/250Q,	311A/250E,	311A/252Y,	311A/256E,	311A/286D,
311A/308F,	311A/308Y,			311A/380A,
311A/428L,	311A/428F,	311A/434H,	311A/434F,	311A/434Y,
311A/434A,	311A/434M,	311A/434S		

311V

311V/250Q,	311V/250E,	311V/252Y,	311V/256E,	311V/286D,
311V/308F,	311V/308Y,			311V/380A,
311V/428L,	311V/428F,	311V/434H,	311V/434F,	311V/434Y,
311V/434A,	311V/434M,	311V/434S		

**Figura 31b**380A

380A/250Q,	380A/250E,	380A/252Y,	380A/256E,	380A/286D,
380A/308F,	380A/308Y,	380A/311A,	380A/311V,	380A/428L,
380A/428F,	380A/434H,	380A/434F,	380A/434Y,	380A/434A,
380A/434M,	380A/434S			

428L

428L/250Q,	428L/250E,	428L/252Y,	428L/256E,	428L/286D,
428L/308F,	428L/308Y,	428L/311A,	428L/311V,	428L/380A,
428L/434H,	428L/434F,	428L/434Y,	428L/434A,	428L/434M,
428L/434S				

428F

428F/250Q,	428F/250E,	428F/252Y,	428F/256E,	428F/286D,
428F/308F,	428F/308Y,	428F/311A,	428F/311V,	428F/380A,
428F/434H,	428F/434F,	428F/434Y,	428F/434A,	428F/434M,
428F/434S				

434H

434H/250Q,	434H/250E,	434H/252Y,	434H/256E,	434H/286D,
434H/308F,	434H/308Y,	434H/311A,	434H/311V,	434H/380A,
434H/428L,	434H/428F			

434F

434F/250Q,	434F/250E,	434F/252Y,	434F/256E,	434F/286D,
434F/308F,	434F/308Y,	434F/311A,	434F/311V,	434F/380A,
434F/428L,	434F/428F			

434Y

434Y/250Q,	434Y/250E,	434Y/252Y,	434Y/256E,	434Y/286D,
434Y/308F,	434Y/308Y,	434Y/311A,	434Y/311V,	434Y/380A,
434Y/428L,	434Y/428F			

434A

434A/250Q,	434A/250E,	434A/252Y,	434A/256E,	434A/286D,
434A/308F,	434A/308Y,	434A/311A,	434A/311V,	434A/380A,
434A/428L,	434A/428F			

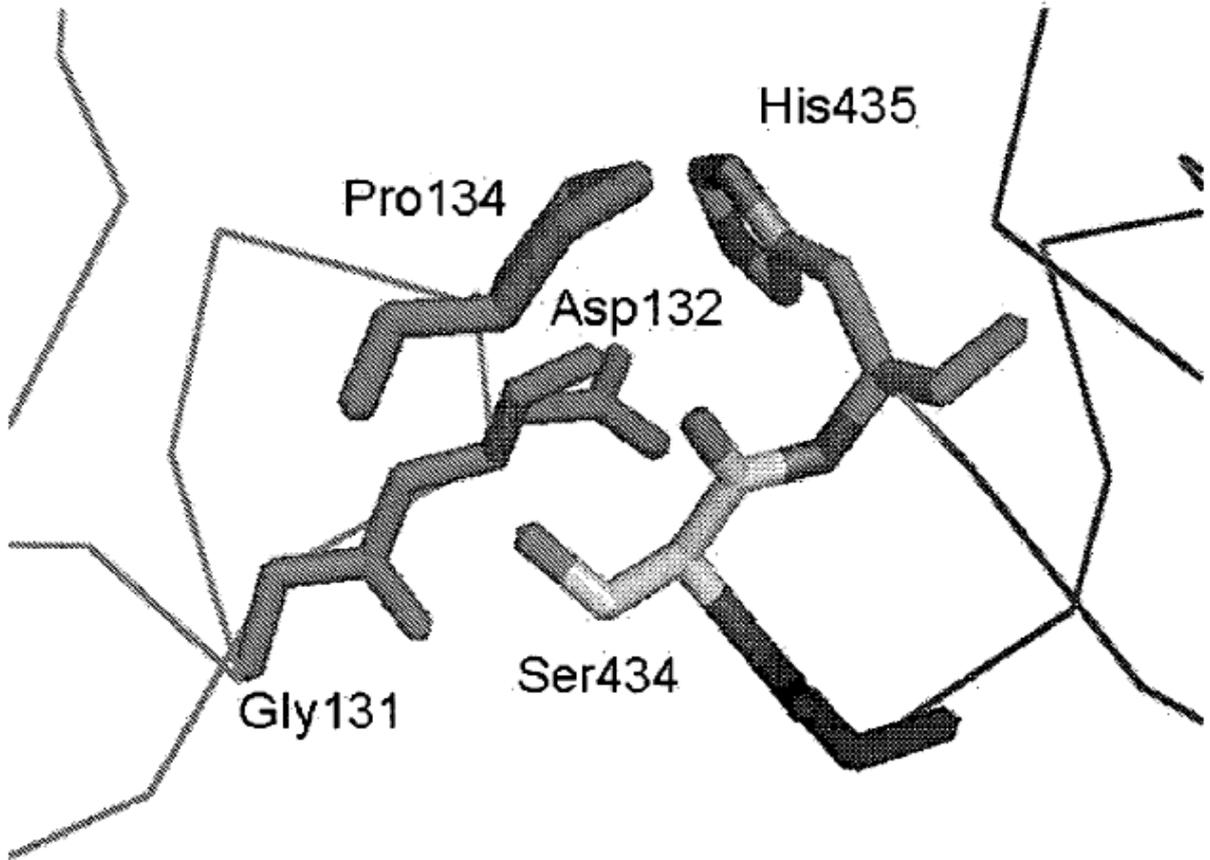
434M

434M/250Q,	434M/250E,	434M/252Y,	434M/256E,	434M/286D,
434M/308F,	434M/308Y,	434M/311A,	434M/311V,	434M/380A,
434M/428L,	434M/428F			

434S

434S/250Q,	434S/250E,	434S/252Y,	434S/256E,	434S/286D,
434S/308F,	434S/308Y,	434S/311A,	434S/311V,	434S/380A,
434S/428L,	434S/428F			

Figura 32



v