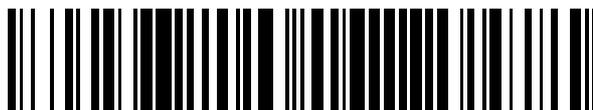


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 177**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2003 E 10184682 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015 EP 2345671**

54 Título: **Variantes de Fc optimizadas y métodos para su generación**

30 Prioridad:

27.09.2002 US 414433 P

23.01.2003 US 442301 P

02.05.2003 US 467606 P

12.06.2003 US 477839 P

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

02.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LAZAR, GREGORY ALAN;
CHIRINO, ARTHUR J.;
DANG, WEI;
DESJARLAIS, JOHN RUDOLPH;
DOBERSTEIN, STEPHEN KOHN;
HAYES, ROBERT J.;
KARKI, SHER BUSUDUR y
VAFA, OMID**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 562 177 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de Fc optimizadas y métodos para su generación

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos son proteínas inmunológicas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluidos los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas. Cada cadena está constituida por dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales, y por tanto para dichas proteínas se usa el término genérico de inmunoglobulina. Cada cadena está constituida por dos regiones distintas, denominadas regiones constantes y variables. Las regiones variables de cadena ligera y pesada muestran diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos y son responsables de la unión del antígeno diana. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencia y son responsables de la unión de diversas proteínas naturales que suscitan importantes acontecimientos bioquímicos. En los seres humanos hay 15 cinco clases de anticuerpos diferentes que incluyen la IgA (que incluye las subclases IgA1 e IgA2), la IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y la IgM. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos y sus regiones constantes, aunque con sutiles diferencias, pueden existir en la región V. La Figura 1 muestra un anticuerpo de IgG1, que se utiliza en el presente documento como un ejemplo para describir las características estructurales generales de las inmunoglobulinas. Los anticuerpos de IgG son proteínas tetraméricas 20 compuestas de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. La cadena pesada de IgG está compuesta de cuatro dominios de inmunoglobulina ligados desde el extremo N al C en el orden VH-Cy1-Cy2-Cy3, que hace 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 de dos dominios de inmunoglobulina ligados desde el extremo N al C en el orden VL- CL, que hace referencia al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de cadena ligera respectivamente. 25

La región variable de un anticuerpo contiene los determinantes de unión antigénicos de la molécula y por tanto determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se denomina así por ser la que más se diferencia, en cuanto a su secuencia, de otros anticuerpos dentro de la misma clase. La mayoría de la 30 variabilidad de secuencia se produce en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En total hay 6 CDR, tres por cada una de la cadena pesada y ligera, denominadas CDR1 V_H, CDR2 V_H, CDR3 V_H, CDR1 V_L, CDR2 V_L y CDR3 V_L. La región variable fuera de las CDR se denomina región marco conservada (FR, del inglés *framework*). Aunque no tan diversa como las CDR, la variabilidad de secuencia se produce en la región FR entre los diferentes anticuerpos. En general, esta arquitectura característica de los anticuerpos proporciona un armazón estable (la región FR) sobre la cual puede explorarse la diversidad de unión antigénica sustancial (las CDR) a través del sistema inmunitario para obtener especificidad para una amplia serie de antígenos. Se dispone de diversas 35 estructuras de alta resolución para una variedad de fragmentos de región variable de diferentes organismos, algunos no unidos y algunos formando complejos con el antígeno. Las características de secuencia y estructurales de las regiones variables de los anticuerpos 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 modificación de los anticuerpos mediante ingeniería genética (Maynard *et al.*, 40 2000, *Annu Rev Biomed Eng* 2: 339-376). Por ejemplo, es posible injertar las CDR de un anticuerpo, por ejemplo de un anticuerpo murino, en la región marco conservada de otro anticuerpo, por ejemplo de un anticuerpo humano. Este proceso, denominado en la técnica "humanización", permite generar agentes terapéuticos basados en anticuerpos menos inmunogénicos a partir de anticuerpos no humanos. Los fragmentos que comprenden la región variable pueden existir en ausencia de otras regiones del anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, el fragmento de unión a antígeno (Fab) que comprende V_H-C_{V1} y V_H-C_L, el fragmento variable (Fv) que comprende V_H y V_L, el fragmento variable monocatenario (scFv, *single chain Fv*) que comprende V_H y V_L ligadas entre sí en la misma cadena, así como una variedad de otros fragmentos de la región variable (Little *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21: 364-370). 45

50 La región Fc de un anticuerpo interacciona con diversos receptores y ligandos de Fc, confiriendo una serie de capacidades funcionales importantes denominadas funciones efectoras. Para la IgG, la región Fc, como se muestra en la Figura 1, comprende los dominios Cy2 y Cy3 de la Ig y la bisagra N terminal que conduce al interior de Cy2. Una importante familia de receptores de Fc de la clase de IgG son los receptores Fc gamma (FcγR). Estos receptores actúan como mediadores en la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunitario (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 FcγRI (CD64), que incluye las isoformas FcγRIa, FcγRIb, y FcγRIc; FcγRII (CD32), que incluye las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), que incluye las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb- NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65). Típicamente, estos receptores tienen un dominio extracelular que actúa como mediador en la unión a Fc, una región transmembrana, y un dominio intracelular que puede actuar como mediador en algún 60

acontecimiento de señalización en la célula. Estos receptores se expresan en un diversas células inmunitarias que incluyen, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos grandes granulares, células de Langerhans, linfocitos citolíticos (NK, *natural killer*) naturales, y linfocitos T y γ . La formación del complejo Fc/Fc γ R recluta estas células efectoras en sitios de unión antigénica, produciendo típicamente acontecimientos de señalización en las células e importantes respuestas inmunitarias posteriores tales como la liberación de mediadores inflamatorios, la activación de linfocitos B, la endocitosis, fagocitosis y ataque citotóxico. La capacidad de actuar como mediador en las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un posible mecanismo mediante el cual los anticuerpos destruyen células diana. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los Fc γ R reconocen el antígeno unido en una célula diana y posteriormente causa la lisis de la célula diana se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) (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 células citotóxicas no específicas que expresan los Fc γ R reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causa la fagocitosis de la célula diana se denomina fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP, del inglés *antibody dependent cell-mediated phagocytosis*). Se han resuelto diversas estructuras de los dominios extracelulares de los Fc γ R humanos, incluyendo Fc γ RIIa (código de registro pdb 1H9V)(Sondermann *et al.*, 2001, J Mol Biol 309: 737-749) (código de registro pdb 1 FCG)(Maxwell *et al.*, 1999, Nat Struct Biol 6: 437-442), Fc γ RIIb (código de registro pdb 2FCB)(Sondermann *et al.*, 1999, Embo J 18:1095-1103); y Fc γ RIIIb (código de registro pdb 1 E4J)(Sondermann *et al.*, 2000, Nature 406: 267-273.). Todos los Fc γ R se unen a la misma región sobre Fc, en el extremo N terminal del dominio Cy2 y la bisagra precedente, como se muestra en la Figura 2. Esta interacción está bien caracterizada estructuralmente (Sondermann *et al.*, 2001, J Mol Biol 309: 737-749), y se han resuelto diversas estructuras de Fc humano unido al dominio extracelular de Fc γ RIIIb humano (código de registro pdb 1 E4K) (Sondermann *et al.*, 2000, Nature 406: 267-273) (códigos de registro pdb 1IIS y 1IIX)(Radaev *et al.*, 2001, J Biol Chem 276: 16469-16477), así mismo tiene la estructura del complejo Fc/Fc γ RII de la IgE humana (código de registro pdb 1F6A)(Garman *et al.*, 2000, Nature 406: 259-266).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los Fc γ R, uniéndose sustancialmente la IgG1 e IgG3 típicamente mejor a los receptores que la IgG2 e IgG4 (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82: 57-65). Todos los Fc γ R se unen a la misma región en Fc de la IgG, incluso con diferentes afinidades: la mayor afinidad de unión de Fc γ RI tiene una Kd para la IgG1 de 10^{-8} M $^{-1}$, mientras que los receptores de menor afinidad Fc γ RII y Fc γ RIII generalmente se unen a 10^{-6} y 10^{-5} respectivamente. Los dominios extracelulares de Fc γ RIIIa y Fc γ RIIIb son 96 % idénticos, sin embargo Fc γ RIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que Fc γ RI, Fc γ RIIa/c y Fc γ RIIIa son reguladores positivos de la activación desencadenada por el complejo inmunitario, que se caracteriza por tener un dominio intracelular que tiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM, del inglés *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), Fc γ RIIb tiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM, del inglés *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) y es por lo tanto inhibidor. Por tanto los primeros se denominan receptores de activación y Fc γ RIIb se denomina receptor de inhibición. Los receptores también se diferencian en el patrón de expresión y en los niveles en diferentes células inmunitarias. Incluso otro nivel de complejidad es la existencia de diversos polimorfismos de Fc γ R en el proteoma humano. Un polimorfismo particularmente relevante con significado clínico es el alotipo V158/F158 de Fc γ RIIIa. La IgG1 humana se unen con mayor afinidad al alotipo V158 que al alotipo F158. Esta diferencia en afinidad, y supuestamente su efecto sobre la ADCC y/o la ADCP, ha demostrado ser un determinante significativo de la eficacia del anticuerpo anti-CD20 rituximab (Rituxan®, una marca comercial registrada de IDEC Pharmaceuticals Corporation). Los pacientes con el alotipo V158 responden favorablemente al tratamiento con rituximab; sin embargo, los pacientes con el alotipo F158 de menor afinidad responden mal a dicho tratamiento (Cartron *et al.*, 2002, Blood 99: 754-758). Aproximadamente el 10-20 % de los seres humanos son homocigotos V158/V158, el 45 % son heterocigotos V158/F158 y el 35-45 % son homocigotos F158/F158 (Lehmbecher *et al.*, 1999, Blood 94: 4220-4232; Cartron *et al.*, 2002, Blood 99: 754-758). Por tanto, el 80-90 % de los seres humanos responden mal, es decir tienen al menos un alelo del alotipo F158 de Fc γ RIIIa.

Un sitio solapante pero distinto sobre Fc, mostrado en la Figura 1, sirve como la interfaz para la proteína del complemento C1q. De la misma manera que la unión de Fc/Fc γ R actúa como mediadora de la ADCC, la unión de Fc/C1q actúa como mediadora de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). C1q forma un complejo con las serina proteasas C1r y C1s para formar el complejo C1. C1q puede unirse a seis anticuerpos, aunque la unión a dos IgG es suficiente para activar la cascada del complemento. Similar a la interacción de Fc con los Fc γ R, diferentes subclases de IgG tienen diferente afinidad por C1q, uniéndose sustancialmente la IgG1 e IgG3 típicamente mejor a los Fc γ R que la IgG2 e IgG4 (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82: 57-65). Actualmente no se dispone de ninguna estructura para el complejo Fc/C1q; sin embargo, estudios de mutagénesis han mapeado el sitio de unión en la IgG humana para C1q en una región que implica a los restos D270, K322, K326, P329, P331 y E333 (Idusogie *et al.*, 2000, J Immunol 164: 4178-4184; Idusogie *et al.*, 2001, J Immunol 166: 2571-2575).

Un sitio sobre Fc entre los dominios Cy2 y Cy3, mostrado en la Figura 1, actúa como mediador en la interacción con el receptor neonatal FcRn, cuya unión recicla anticuerpos introducidos por endocitosis desde el endosoma de vuelta 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, junto con la exclusión de la filtración renal debido al gran tamaño de la

molécula de longitud completa, da como resultado semividas en suero de anticuerpos favorables que varían de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también desempeña una función clave en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión para FcRn sobre Fc es también el sitio en el que se unen las proteínas bacterianas A y G. La estrecha unión por estas proteínas se aprovecha típicamente como un medio para purificar anticuerpos empleando la cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G durante la purificación de proteínas. Por tanto la fidelidad de esta región sobre Fc es importante para las propiedades clínicas de los anticuerpos y para su purificación. Las estructuras disponibles del complejo Fc/FcRn de rata (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: 265278; Tashiro *et al.*, 1995, *Curr Opin Struct Biol* 5: 471-481) dan una idea acerca de la interacción de Fc con estas proteínas.

Una característica clave de la región Fc es la glucosilación ligada a N conservada que se produce en N297, mostrado en la Figura 1. Este hidrato de carbono, u oligosacárido, como algunas veces se le denomina, desempeña un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales de que los anticuerpos deban producirse usando sistemas de expresión de mamífero. Aunque sin desear limitarse a ninguna teoría, se piensa que la finalidad estructural de este hidrato de carbono puede ser estabilizar o solubilizar a Fc, determinar un ángulo o nivel de flexibilidad específico entre los dominios Cy3 y Cy2, impedir la agregación de los dos dominios Cy2 entre sí, a través del eje central o una combinación de estos.

La unión eficaz de Fc a FcγR y a C1q requiere esta modificación y alteraciones en la composición del hidrato de carbono N297 o su eliminación afecta a la unión con estas proteínas (Umana *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). No obstante el hidrato de carbono hace escaso contacto, si hace alguno, con los FcγR (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477), lo que indica que el papel funcional del hidrato de carbono N297 en la mediación de la unión de Fc/FcγR puede ser mediante el papel estructural que desempeña en la determinación de la conformación de Fc. Esto se confirma mediante un conjunto de estructuras cristalinas de cuatro glucoformas de Fc diferentes, que muestran que la composición del oligosacárido influye en la conformación de Cy2 y como resultado en la interfaz de Fc/FcγR (Krapp *et al.*, 2003, *J Mol Biol* 325: 979-989).

Las características de los anticuerpos indicadas anteriormente - especificidad por la diana, capacidad de actuar como mediadores en mecanismos efectoros inmunitarios y larga semivida en suero - hace que los anticuerpos sean compuestos terapéuticos poderosos. Los anticuerpos monoclonales se usan terapéuticamente para el tratamiento de diversas afecciones que incluyen cáncer, inflamación y enfermedades cardiovasculares. Actualmente hay más de diez productos de anticuerpos en el comercio y centenas de ellos en desarrollo. Además de los anticuerpos, una proteína similar a un anticuerpo que está encontrando un papel en expansión en investigación y en terapia es la fusión de Fc (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200). Una fusión de Fc es una proteína en la que uno o más polipéptidos están unidos operativamente a Fc. Una fusión Fc comprende la región Fc de un anticuerpo y por tanto sus funciones efectoras y farmacocinéticas favorables, con la región de unión a la diana de un receptor, un ligando o alguna otra proteína o dominio de proteína. Esta última función es mediar en el reconocimiento de la diana, y por tanto es funcionalmente análoga a la región variable del anticuerpo. Debido al solapamiento estructural y funcional de las fusiones de Fc con anticuerpos, el análisis sobre anticuerpos en la presente invención se amplía directamente a fusiones de Fc.

A pesar de dicho uso generalizado, los anticuerpos no están optimizados para su uso clínico. Dos deficiencias significativas de los anticuerpos son su fuerza anticancerosa subóptima y sus exigentes requisitos de producción. La invención aborda estas deficiencias.

Existen diversos mecanismos posibles mediante los cuales los anticuerpos destruyen células tumorales, incluyendo la antiproliferación mediante el bloqueo de rutas de crecimiento necesarias, la señalización intracelular que conduce a apoptosis, la regulación negativa y/o la renovación de receptores potenciada, la CDC, ADCC, ADCP y la promoción de una respuesta inmunitaria adaptativa (Gragg *et al.*, 1999, *Curr Opin Immunol* 11: 541-547; Glennie *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21: 403-410). La eficacia antitumoral puede deberse a una combinación de estos mecanismos, y su importancia relativa en terapia clínica parece ser dependiente del cáncer. A pesar de este arsenal de armas antitumorales, la fuerza de los anticuerpos como agentes anticancerosos es insatisfactoria, particularmente dado su elevado coste. Los datos de respuesta tumoral de los pacientes muestran que los anticuerpos monoclonales proporcionan solo una pequeña mejora en el éxito terapéutico sobre los agentes quimioterapéuticos citotóxicos normales de un solo agente. Por ejemplo, tan solo la mitad de todos los pacientes reincidentes con linfoma no Hodgkin de grado bajo responden al anticuerpo anti-CD20 rituximab (McLaughlin *et al.*, 1998, *J Clin Oncol* 16: 2825-2833). De 166 pacientes clínicos, el 6 % mostró una respuesta completa y el 42 % mostró una respuesta parcial, con una duración de respuesta media de aproximadamente 12 meses. Trastuzumab (Herceptin®, una marca comercial registrada de Genentech), un anticuerpo anti-HER2/neu para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, tiene menos eficacia. La tasa de respuesta global usando trastuzumab en los 222 pacientes sometidos a ensayo fue solo del 15 %, con 8 respuestas completas y 26 parciales y con una duración de respuesta media y supervivencia de 9 a 12 meses (Cobleigh *et al.*, 1999, *J Clin Oncol* 17: 2639-2648). Actualmente para la terapia contra el cáncer, cualquier pequeña mejora en la tasa de mortalidad define un logro. Por tanto existe una necesidad significativa de potenciar la capacidad de los anticuerpos para destruir células cancerosas diana.

Un medio prometedor para potenciar la fuerza antitumoral de los anticuerpos es potenciar su capacidad para actuar como mediadores en las funciones efectoras citotóxicas tales como ADCC, ADCP, y CDC. La importancia de las funciones efectoras mediadas por FcγR para la actividad contra el cáncer de los anticuerpos se ha demostrado en ratones (Clynes *et al.*, 1998, Proc Natl Acad Sci USA 95: 652-656; Clynes *et al.*, 2000, Nat Med 6: 443-446) y la afinidad de interacción entre Fc y determinados FcγR se correlaciona con citotoxicidad dirigida en ensayos basados en células (Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276: 6591-6604; Presta *et al.*, 2002, Biochem Soc Trans 30: 487-490; Shields *et al.*, 2002, J Biol Chem 277: 26733-26740). Adicionalmente, se ha observado una correlación entre la eficacia clínica en seres humanos y su alotipo de formas polimórficas de alta (V158) o baja (F158) afinidad de FcγRIIIa (Cartron *et al.*, 2002, Blood 99: 754758). En su conjunto estos datos sugieren que un anticuerpo con una región Fc optimizada para la unión a determinados FcγR puede mediar mejor las funciones efectoras y por lo tanto destruir células cancerosas de un modo más eficaz en los pacientes. El equilibrio entre los receptores de activación y de inhibición es una cuestión importante, y una función efectora óptima puede dar como resultado un Fc con afinidad potenciada para los receptores de activación, por ejemplo FcγRI, FcγRIIa/c y FcγRIIIa, incluso afinidad reducida por el receptor inhibidor FcγRIIb. Además, dado que los FcγR pueden mediar la captación de antígenos y el procesamiento por células presentadoras de antígeno, la afinidad potenciada de Fc/FcγR también puede mejorar la capacidad de los agentes terapéuticos basados en anticuerpos para suscitar una respuesta inmunitaria adaptativa.

Se han realizado estudios de mutagénesis en Fc hacia diversos objetivos, realizándose típicamente sustituciones con alanina (lo que se denomina mutagénesis con alanina) o guiadas por sustituciones de homología de secuencia (Duncan *et al.*, 1988, Nature 332: 563-564; Lund *et al.*, 1991, J Immunol 147: 2657-2662; Lund *et al.*, 1992, Mol Immunol 29: 53-59; Jefferis *et al.*, 1995, Immunol Lett 44: 111-117; Lund *et al.*, 1995, FASEB J 9: 115-119; Jefferis *et al.*, 1996, Immunol Lett 54: 101-104; Lund *et al.*, 1996, J Immunol 157: 4963-4969; Armour *et al.*, 1999, Eur J Immunol 29: 2613-2624; Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276: 6591-6604; Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82: 57-65) (documentos US 5.624.821; US 5.885.573; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572). La mayoría de las sustituciones reducen o anulan la unión con los FcγR. Sin embargo, se han logrado algunos éxitos al obtener variantes de Fc con mayor afinidad por FcγR. (Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.624.821, y PCT WO 00/42072). Por ejemplo, Winter y colaboradores sustituyeron el aminoácido humano en la posición 235 del anticuerpo de IgG2b de ratón (una mutación de ácido glutámico por leucina) que aumentó 100 veces la unión del anticuerpo de ratón por el FcγRI humano (Duncan *et al.*, 1988, Nature 332: 563-564) (documento US 5.624.821). Shields *et al.* usaron exploración con alanina para mapear restos Fc importantes para la unión a FcγR, seguido por la sustitución de restos seleccionados con mutaciones que no son con alanina (Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276: 6591-6604; Presta *et al.*, 2002, Biochem Soc Trans 30: 487490) (documento PCT WO 00/42072). Diversas mutaciones desveladas en este estudio, incluyendo S298A, E333A, y K334A, muestran una unión potenciada con el receptor de activación FcγRIIIa y una unión reducida con el receptor inhibidor FcγRIIb. Estas mutaciones se combinaron para obtener variantes de mutación dobles y triples que muestran mejoras aditivas en la unión. La mejor variante desvelada en este estudio es un mutante triple S298A/E333A/K334A con un aumento de aproximadamente 1,7 veces en la unión con F158 de FcγRIIIa, una disminución de 5 veces en la unión con FcγRIIb, y una potenciación de 2,1 veces en la ADCC.

También se ha conseguido afinidad potenciada de Fc por FcγR usando glucoformas modificadas por ingeniería genética generadas por expresión de anticuerpos en líneas celulares modificadas por ingeniería genética o variantes (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). Esta estrategia ha generado mejoras sustanciales de la capacidad de los anticuerpos para unirse a FcγRIIIa y mediar la ADCC. Aunque hay limitaciones prácticas tales como la eficacia del crecimiento de las cepas de expresión en condiciones de producción a gran escala, esta estrategia para potenciar la afinidad de Fc/FcγR y la función efectora es prometedora. De hecho, el acoplamiento de estas tecnologías de glucoformas alternativas con las variantes de Fc de la presente invención puede proporcionar efectos aditivos o sinérgicos para una función efectora óptima.

Aunque se requiere una mayor función efectora, para algunos agentes terapéuticos basados en anticuerpos, puede desearse una función efectora reducida o eliminada. Esto es con frecuencia el caso de anticuerpos terapéuticos cuyo mecanismo de acción implica el bloqueo o el antagonismo pero no la destrucción de las células que llevan el antígeno diana. En estos casos la reducción de células dianas no es deseable y puede considerarse un efecto secundario. Por ejemplo, la capacidad de los anticuerpos anti-CD4 para bloquear a los receptores de CD4 sobre los linfocitos T hace que sean antiinflamatorios eficaces, incluso su capacidad para reclutar receptores de FcγR también dirige el ataque inmunitario contra las células diana, dando como resultado la reducción de linfocitos T (Reddy *et al.*, 2000, J Immunol 164: 1925-1933). La función efectora también puede ser un problema para anticuerpos radiomarcados, denominados radioconjugados, y para los anticuerpos conjugados con toxinas, denominados inmunotoxinas. Estos fármacos pueden usarse para destruir células cancerosas, pero el reclutamiento de células inmunitarias a través de la interacción de Fc con los FcγRs pone en contacto las células inmunitarias sanas con la carga mortífera (radiación o toxina), produciendo la reducción de tejido linfoide normal junto con las células cancerosas diana (Hutchins *et al.*, 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92: 11980-11984; White *et al.*, 2001, Annu Rev Med 52: 125-145). Posiblemente este problema puede eludirse usando de isotipos de IgG que reclutan mal el complemento o células efectoras, por ejemplo, IgG2 e IgG4. Una solución alternativa es desarrollar variantes de Fc que reduzcan o anulen la unión (Alegre *et al.*, 1994, Transplantation 57: 1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92: 11980-11984; Armour *et al.*, 1999, Eur J Immunol 29: 2613-2624; Reddy *et al.*, 2000, J Immunol

164:19251933; Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol 200:16-26; Shields *et al.*, 2001, J Biol Chem 276:6591-6604) (documentos US 6.194.551; US 5.885.573; PCT WO 99/58572). Una cuestión crítica para la reducción o eliminación de la función efectora es que no se alteren otras propiedades importantes del anticuerpo. Las variantes de Fc deben modificarse por ingeniería genética de manera que no solo se elimine la unión con los FcγR y/o con C1q, sino que también se mantenga la estabilidad, solubilidad e integridad estructural del anticuerpo, así como la capacidad de interaccionar con otros ligandos de Fc importantes tales como FcRn y proteínas A y G.

La presente invención aborda otro inconveniente principal de los anticuerpos, concretamente sus exigentes requisitos de producción (Garber, 2001, Nat Biotechnol 19: 184-185; Dove, 2002, Nat Biotechnol 20: 777-779). Los anticuerpos deben expresarse en células de mamífero, y los anticuerpos actualmente comercializados junto con otros agentes bioterapéuticos de alta demanda consumen esencialmente toda la capacidad de fabricación disponible. Con cientos de agentes biológicos en desarrollo, la mayoría de los cuales son anticuerpos, existe una necesidad urgente de métodos de producción que sean más eficaces y asequibles. Los efectos aguas abajo de la capacidad de elaboración de anticuerpos insuficiente se triplican. En primer lugar, esto eleva drásticamente los costes de los artículos al productor, un coste que se transfiere al paciente. En segundo lugar, obstaculiza la producción industrial de productos de anticuerpos autorizados, limitando a los pacientes la disponibilidad de agentes terapéuticos de alta demanda. Finalmente, dado que los ensayos clínicos requieren grandes cantidades de una proteína que aún no es rentable, el suministro insuficiente impide el progreso del desarrollo del anticuerpo en crecimiento en el mercado.

Se han explorado métodos de producción alternativos en intentos para aliviar este problema. Las plantas y animales transgénicos se están aplicando como sistemas de producción de mayor capacidad y posiblemente más asequibles (Chadd *et al.*, 2001, Curr Opin Biotechnol 12: 188-194). Sin embargo, dichos sistemas de expresión pueden generar patrones de glucosilación significativamente diferentes de los de las glucoproteínas humanas. Esto puede dar como resultado una reducción o incluso una ausencia de función efectora porque, como se ha indicado anteriormente, la estructura del carbohidrato puede afectar significativamente al FcγR y a la unión al complemento. Un problema posiblemente más importante con las glucoformas no humanas puede ser la inmunogenicidad; los hidratos de carbono son una fuente clave de antigenicidad para el sistema inmunitario, y la presencia de glucoformas no humanas tiene una probabilidad significativa de suscitar anticuerpos que neutralicen los agentes terapéuticos, o empeoren las causas de las reacciones inmunitarias adversas. Por tanto la eficacia y seguridad de los anticuerpos producidos por plantas y animales transgénicos siguen siendo inciertas. La expresión bacteriana es otra solución atractiva para el problema de producción de anticuerpos. La expresión en bacterias, por ejemplo, en *E. coli*, proporciona un método rentable y de alta capacidad para la producción de proteínas. Para proteínas complejas, tales como anticuerpos, existen diversos obstáculos para la expresión bacteriana, incluyendo el plegamiento y el ensamblaje de estas moléculas complejas, la formación correcta de enlaces disulfuro y la solubilidad, estabilidad y funcionalidad en ausencia de glucosilación dado que las proteínas expresadas en las bacterias no están glucosiladas. Los anticuerpos no glucosilados de longitud completa que se unen a antígeno se han expresado satisfactoriamente en *E. coli* (Simmons *et al.*, 2002, J Immunol Methods 263: 133-147), y por tanto, el plegamiento, ensamblaje y formación correcta de enlaces disulfuro de los anticuerpos expresados en bacterias es posible en ausencia de una maquinaria chaperona eucariota. Sin embargo, la utilidad final de los anticuerpos expresados en bacterias como agentes terapéuticos sigue estando obstaculizada por la ausencia de glucosilación; que produce ausencia de función efectora y puede producir mala estabilidad y solubilidad. Para la formulación a las altas concentraciones durante los periodos prolongados exigidos por el uso clínico esto será probablemente más problemático. El documento WO04/2072 se refiere a polipéptidos que contienen la región Fc que tiene la función efectora alterada.

Un Fc aglucosilado con propiedades de solución favorables y con la capacidad de mediar funciones efectoras permitiría de un modo significativo los métodos de producción alternativos descritos anteriormente. Superando los inconvenientes estructurales y funcionales de los anticuerpos Fc aglucosilados, se pueden producir anticuerpos en bacterias y en plantas y animales transgénicos con riesgo de inmunogenicidad reducido y con función efectora para aplicaciones clínicas, tales como para el cáncer, en las que se desea citotoxicidad. La presente divulgación describe la utilización de métodos de modificación por ingeniería genética de proteínas para desarrollar variantes estables, solubles de Fc con función efectora. Actualmente, dichas variantes de Fc no existen en la técnica.

En resumen, existe una necesidad de anticuerpos con propiedades terapéuticas potenciadas. La modificación por ingeniería genética de variantes de Fc optimizadas o potenciadas es una estrategia prometedora para satisfacer esta necesidad. No obstante, un obstáculo sustancial para la modificación por ingeniería genética de variantes de Fc con las propiedades deseadas, es la dificultad de predecir qué modificaciones de aminoácidos, de las enormes diversas posibilidades, conseguirán los objetivos deseados, junto con la producción y los métodos de exploración ineficaces de los anticuerpos. De hecho uno de las principales razones del éxito incompleto de la técnica anterior es que las estrategias para la modificación por ingeniería genética de Fc tienen métodos de acierto o erróneos hasta ahora involucrados, tales como exploraciones con alanina o producción de glucoformas usando diferentes cepas de expresión. En estos estudios, las modificaciones de Fc que se realizaron fueron total o parcialmente al azar con la esperanza de obtener variantes con propiedades favorables. La presente divulgación proporciona una variedad de métodos de modificación por ingeniería genética, muchos de los cuales se basan en técnicas más sofisticadas y eficaces, que pueden usarse para superar estos obstáculos con objeto de desarrollar variantes de Fc que estén optimizadas con respecto a las propiedades deseadas. Los métodos de modificación por ingeniería genética

descritos proporcionan estrategias de diseño para guiar la modificación de Fc, métodos de exploración computacional para diseñar variantes de Fc favorables, estrategias de generación de bibliotecas para determinar variantes prometedoras para la investigación experimental y una serie de métodos de producción experimental y de exploración para determinar las variantes de Fc con propiedades favorables.

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona variantes de Fc, como se define en las reivindicaciones, que están optimizadas con respecto a diversas propiedades terapéuticamente relevantes.

La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican las variantes de Fc como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona vectores como se define en las reivindicaciones que comprenden dichos ácidos nucleicos, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. La presente invención proporciona células hospedadoras como se define en las reivindicaciones que contienen los vectores. Se desvelan métodos para producir y opcionalmente recuperar las variantes de Fc.

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos y fusiones de Fc que comprenden las variantes de Fc como se define en las reivindicaciones. Dichos nuevos anticuerpos y fusiones de Fc pueden encontrar uso en un producto terapéutico.

La presente invención proporciona composiciones que comprenden anticuerpos y fusiones de Fc que comprenden las variantes de Fc como se define en las reivindicaciones, y un transportador o diluyente fisiológica o farmacéuticamente aceptable.

La presente divulgación contempla usos terapéuticos y diagnósticos para los anticuerpos y las fusiones de Fc que comprenden las variantes de Fc desveladas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

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

Figura 2. Estructura compleja de Fc/FcγRIIIb 1IIS. Fc se muestra como un diagrama de lazo de color gris, y FcγRIIIb se muestra como un lazo de color negro. El hidrato de carbono N297 se muestra como barras de color negro.

Figura 3. Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo alemtuzumab (Campath®, una marca comercial registrada de Ilex Pharmaceuticals LP), ilustrando posiciones numeradas secuencialmente (2 líneas por encima de la secuencia de aminoácidos) y posiciones numeradas de acuerdo con el índice de EU como en Kabat (2 líneas por debajo de la secuencia de aminoácidos). Los inicios aproximados de los dominios de Ig, VH1, Cy1, la bisagra, Cy2 y Cy3 también están marcados encima de la numeración secuencial. Se han observado polimorfismos en diversas posiciones de Fc, incluyendo, pero sin limitación las posiciones Kabat 270, 272, 312, 315, 356, y 358, y por tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la técnica anterior.

Figura 4. Restos de bibliotecas experimentales mapeados sobre la estructura compleja de Fc/FcγRIIIb 1IIS. Fc se muestra como un diagrama de lazo gris, y FcγRIIIb se muestra como un lazo negro. Los restos de bibliotecas experimentales se muestran como bolas y barras negras. El hidrato de carbono N297 se muestra como barras negras.

Figura 5. Secuencia de Fc de IgG1 humana mostrando posiciones relevantes para el diseño de la biblioteca experimental de la variante de Fc. La secuencia incluye la región bisagra, el dominio Cy2, y el dominio Cy3. Los números de los restos son de acuerdo con el índice EU como en Kabat. Las posiciones relevantes en la biblioteca experimental se indican subrayadas. Debido a las mutaciones polimórficas observadas en diversas posiciones de Fc, pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias de la bibliografía.

Figura 6. Expresión de variantes de Fc y de proteínas de tipo silvestre (TS) de alemtuzumab en células 293T. Los plásmidos que contenían los genes de la cadena pesada de alemtuzumab (TS o variantes) se cotransfectaron con plásmidos que contenían el gen de la cadena ligera de alemtuzumab. Los medios de recogieron 5 días después de la transfección. Para cada muestra transfectada, se cargaron 10 ul de medio sobre un gel SDS-PAGE para el análisis de tipo Western. La sonda para el Western fue el anti IgG humano de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson Immuno- Research, catálogo N.º 109-035-088). TS: alemtuzumab de tipo silvestre; 1-10: variantes de alemtuzumab. H y L indican la cadena pesada (H por *Heavy*) y la cadena ligera (L por *Light*), respectivamente, del

anticuerpo.

Figura 7. Purificación de alemtuzumab usando cromatografía con proteína A. Las proteínas de alemtuzumab de TS se expresaron en células 293T y los medios se recogieron 5 días después de la transfección. Los medios se diluyeron a 1:1 con PBS y se purificaron con proteína A. (Pierce, Catálogo N.º 20334). O: muestra original antes de la purificación; FC: flujo continuo; E: elución; C: muestra final concentrada. La figura de la izquierda muestra un gel SDS-PAGE teñido con azul simple y la de la derecha muestra una transferencia de tipo Western marcada usando anti IgG humano de cabra conjugado con peroxidasa.

Figura 8. Producción de anticuerpos desglucosilados. El alemtuzumab de tipo silvestre y sus variantes se expresaron en células 293T y se purificaron con cromatografía de proteína A. Los anticuerpos se incubaron con péptido-N-glucosidasa (PNGasa F) a 37 °C durante 24 horas. Para cada anticuerpo, se realizó en paralelo una muestra tratada con simulación (-PNGasa F). TS: alemtuzumab de tipo silvestre; N.º15, N.º16, N.º17, N.º18, N.º22: variantes de alemtuzumab F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243YA/262TA/264R, y I332E respectivamente. La migración más rápida de las muestras tratadas con PNGasa F frente a las muestras tratadas con simulación representa las cadenas pesadas desglucosiladas.

Figura 9. Alemtuzumab expresado en células 293T se une a su antígeno. El péptido antigénico CD53, fusionado a GST, se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) con inducción IPTG. Las muestras tanto no inducidas como inducidas se procesaron en un gel SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de PVDF. Para el análisis de tipo Western, se usaron alemtuzumab de Sotec (α -CD52, Sotec) (concentración final 2,5 ng/ul) o los medios de células 293T transfectadas (Campath, Xencor) (concentración final de alemtuzumab aproximadamente 0,1-0,2 ng/ul) como anticuerpo primario, y como anticuerpo secundario se usó anti IgG humano de cabra conjugado con peroxidasa. M: marcador previamente teñido; NI: muestra no inducida para GST-CD52; I: muestra inducida para GST-CD52.

Figura 10. Expresión y purificación de la región extracelular del alotipo V158 de Fc γ R1IIa humano. El Fc γ R1IIa marcado se transfectó en células 293T, y los medios secretados que contenían Fc γ R1IIa se recogieron 3 días después y se purificaron usando cromatografía de afinidad. 1: medios; 2: flujo continuo; 3: lavado; 4-8: diluciones en serie. Se muestran los resultados tanto del gel SDS-PAGE teñido con azul simple como de la transferencia de tipo Western. Para la transferencia de tipo Western, la membrana se exploró con anticuerpo anti-GST.

Figura 11. Unión a V158 de Fc γ R1IIa humano mediante variantes de Fc de alemtuzumab de la biblioteca experimental como se determina mediante el ensayo AlphaScreen™, descrito en el Ejemplo 2. En presencia del anticuerpo competidor (variante de Fc o alemtuzumab de TS) se observa una curva de inhibición característica como una disminución en la señal de luminiscencia. Como control negativo se usó solo solución salina tamponada con fosfato (PBS). Estos datos se normalizaron a la señal de luminiscencia máxima y mínima proporcionada por las líneas basales a altas y bajas concentraciones del anticuerpo competidor respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de un sitio usando regresión no lineal. Estos ajustes proporcionan los valores de CI50 de cada anticuerpo, ilustrados para TS y S239D mediante líneas discontinuas.

Figura 12. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab a Fc γ R1Ib humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de un sitio. Como control negativo se usó PBS.

Figura 13. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a Val158 de Fc γ R1IIa humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Se usó PBS como control negativo.

Figura 14. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión a V158 de Fc γ R1IIa humano mediante variantes de Fc seleccionadas en el contexto de rituximab. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

Figura 15. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión a V158 de Fc γ R1IIa humano mediante variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

Figuras 16a - 16b. Ensayo AlphaScreen™ que compara la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas para V158 de Fc γ R1IIa (Figura 16a) y Fc γ R1Ib (Figura 16b) humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

Figura 17. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión a V158 de Fc γ R1IIa humano mediante variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio.

Figura 18. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a R131 de Fc γ R1IIa humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio.

Figuras 19a y 19b. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a V158 de FcγRIIIa humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

5 Figura 20. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab aglucosiladas a V158 de FcγRIIIa humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS

10 Figura 21. Ensayo AlphaScreen™ que compara la unión de V158 FcγRIIIa humano mediante variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas en anticuerpos glucosilados (símbolos negros, líneas gruesas) y desglucosilados (símbolos blancos, líneas discontinuas). Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio.

Figuras 22a - 22b. Ensayo AlphaScreen™ que muestra la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a los alotipos V158 (Figura 22a) y F158 (Figura 22b) de FcγRIIIa humano. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

15 Figuras 23a - 23d. Las Figuras 23a y 23b muestran la correlación entre los valores de Kd de RPS (Resonancia de Plasmón Superficial) y los valores de CI50 de AlphaScreen™ de la unión de las variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a V158 de FcγRIIIa (Figura 23a) y a F158 de FcγRIIIa (Figura 23b). Las Figuras 23c y 23d muestran la correlación entre las veces de mejora de RPS y AlphaScreen™ sobre el TS con respecto a la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas con V158 de FcγRIIIa (Figura 23c) y F158 de FcγRIIIa (Figura 23d). En la Tabla 62 se presentan los datos de unión. Las líneas a través de los datos representan los ajustes lineales de los datos, y los valores r^2 indican el significado de estos ajustes.

20 Figuras 24a - 24b. Ensayos de ADCC basados en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de alemtuzumab. La ADCC se midió usando el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA de DELFIA® (Perkin Elmer, MA), como se describe en el Ejemplo 7, usando células diana de linfoma DoHH-2 y un exceso de 50 veces de CMSP, células mononucleares de sangre periférica, humanas. La Figura 24a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia sin procesar para los anticuerpos de alemtuzumab indicados a 10 ng/ml. La barra de CMSP indica niveles basales de citotoxicidad sin anticuerpo. La Figura 24b muestra la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de alemtuzumab indicados, normalizada a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionada por las líneas basales a bajas y altas concentraciones de anticuerpo respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoidal de respuesta a la dosis usando regresión no lineal.

25 Figuras 25a - 25b. Ensayos de ADCC basados en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de rituximab. La ADCC se midió usando el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA de DELFIA®, como se describe en el Ejemplo 7, usando células diana de linfoma WIL2-S y un exceso de 50 veces de CMSP humanas. La Figura 25a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia sin procesar para los anticuerpos de rituximab indicados a 1 ng/ml. La barra de CMSP indica niveles basales de citotoxicidad sin anticuerpo. La Figura 25b muestra la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de rituximab indicados, normalizada a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionada por las líneas basales a bajas y altas concentraciones de anticuerpo respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoidal de respuesta a la dosis usando regresión no lineal

30 Figuras 26a - 26c. Ensayos de ADCC basados en células de variantes de Fc seleccionadas en el contexto de trastuzumab. La ADCC se midió usando el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA de DELFIA®, como se describe en el Ejemplo 7, usando células diana de carcinoma de mama BT474 y Sk-Br-3 y un exceso de 50 veces de CMSP humanas. La Figura 26a es un gráfico de barras que muestra los datos de fluorescencia sin procesar para los anticuerpos de trastuzumab indicados a 1 ng/ml. La barra CMSP indica niveles basales de citotoxicidad sin anticuerpo. Las Figuras 26b y 26c muestran la dependencia de la dosis de la ADCC sobre la concentración de anticuerpos para los anticuerpos de trastuzumab indicados, normalizada a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionada por las líneas basales a bajas y altas concentraciones de anticuerpo respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoidal de respuesta a la dosis usando regresión no lineal.

35 Figuras 27a - 27b. Capacidad de las variantes de Fc seleccionadas para actuar como mediadoras en la unión y activación del complemento. La Figura 27a muestra un Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión de variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a C1q. Los datos se normalizaron a la señal de luminiscencia máxima y mínima proporcionada por las líneas basales a altas y bajas concentraciones del anticuerpo competidor respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio usando regresión no lineal. La Figura 27b muestra un ensayo basado en células que mide la capacidad de las variantes de Fc de rituximab seleccionadas para actuar como mediadoras en la CDC. Los ensayos de CDC se realizaron usando Azul Amar para monitorizar la lisis de células de linfoma WIL2-S opsonizadas con rituximab de TS y la variante de Fc mediante el complemento sérico humano (Quidel, San Diego, CA). Se muestra la dependencia de la dosis sobre la concentración de anticuerpo de la lisis mediada por el complemento para los anticuerpos de rituximab indicados,

normalizada a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionada por las líneas basales a bajas y altas concentraciones de anticuerpo respectivamente. Las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo sigmoideal de respuesta a la dosis usando regresión no lineal.

5 Figura 28. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión de las variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a una proteína A bacteriana, como se describe en el Ejemplo 9. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

Figura 29. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión de las variantes de Fc de alemtuzumab seleccionadas a FcγRIII de ratón, como se describe en el Ejemplo 10. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

10 Figura 30. Ensayo AlphaScreen™ que mide la unión a V158 de FcγRIIIa humano mediante variantes de Fc de trastuzumab seleccionadas expresadas en células 293T y CHO, como se describe en el Ejemplo 11. Los datos se normalizaron, y las curvas representan los ajustes de los datos a un modelo de competición de sitio. Como control negativo se usó PBS.

15 Figuras 31a- 31c. Secuencias que muestran anticuerpos anti-CD20 mejorados. Las secuencias de la cadena ligera y pesada de rituximab se presentan en la Figura 31a y en la Figura 31b respectivamente, y se toman de la secuencia 3 traducida del documento US 5.736.137. Las posiciones relevantes en la Figura 31b se indican en negrita, incluyendo S239, V240, V264I, N297, S298, A330, y I332. La Figura 31c muestra las secuencias de la cadena pesada del anticuerpo anti CD20 mejoradas, con las posiciones variables como X₁, X₂, X₃, X₄, X_s, X₆ y Z₁, indicadas en negrita. La tabla debajo de la secuencia que proporciona las sustituciones posibles para estas posiciones. Las secuencias de anticuerpo anti-CD20 mejoradas comprenden al menos un aminoácido que no es de TS seleccionado del grupo de posibles sustituciones para X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, y X₆. Estas secuencias de anticuerpo anti-CD20 mejoradas también pueden comprender una sustitución Z₁. Estas posiciones se enumeran de acuerdo con el índice de EU como en Kabat, y por tanto no se corresponden con el orden secuencial en la secuencia.

Descripción detallada de la invención

25 A continuación se exponen diversas definiciones para que la invención pueda entenderse completamente. Dichas definiciones pretenden incluir equivalentes gramaticales.

30 Por "ADCC" o "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es la reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan los FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana.

Por "ADCP" o "fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es la reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan los FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana.

35 Por "modificación de aminoácidos" en la manera que se entiende en el presente documento, se entiende que es una sustitución, inserción y/o delección de aminoácidos en una secuencia polipeptídica. En el presente documento la modificación de aminoácidos preferida es una sustitución **TT

40 Por "anticuerpo", en la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por todos, o parte, de los genes de inmunoglobulina reconocidos. Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo en seres humanos, incluyen los locus genéticos de la cadena kappa (κ), lambda (λ), y pesada, que en su conjunto comprenden la miríada de genes de la región variable y los genes de la región constante mu (μ), delta (δ), gamma (γ), sigma (σ), y alfa (α) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG, IgE, e IgA respectivamente. En el presente documento se entiende que el término anticuerpo incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpo, y puede hacer referencia a un anticuerpo natural de cualquier organismo, a un anticuerpo modificado por ingeniería genética o a un anticuerpo generado de manera recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros, como también se define más adelante. Por tanto, "anticuerpo" incluye anticuerpo tanto monoclonal (mAb) como policlonal. En la técnica se conocen métodos de preparación y purificación de anticuerpos monoclonales y policlonales y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Como se indica en el presente documento, "anticuerpo" incluye específicamente las variantes de Fc descritas en el mismo, anticuerpos de "longitud completa" incluyendo los fragmentos de variantes de Fc descritas en el presente documento, y fusiones de variantes de Fc con otras proteínas como se describe en el presente documento.

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden ser neutralizantes o inhibidores, o estimuladores, y en realizaciones preferidas, como se describe en el presente documento, la actividad estimuladora se mide mediante un aumento en la afinidad de un anticuerpo variante por su receptor, en comparación con el anticuerpo parental (por ejemplo cuando se usa una variante que no es de origen natural como el punto de partida para el análisis de computación del presente documento), o con el anticuerpo original de tipo silvestre. Por consiguiente, en el presente

documento, por “neutralización”, “neutralizar”, “neutralizando” y equivalentes gramaticales se entiende que es inhibir o disminuir el efecto biológico del anticuerpo, en algunos casos, mediante la unión (por ejemplo, competitiva) a un antígeno y evitando o disminuyendo el efecto de unión biológica, o mediante la unión que se produce disminuyendo el efecto de unión biológica.

- 5 Como se sabe en la técnica, el término “anticuerpo” incluye fragmentos de anticuerpo, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, los Fc u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos, tales como, anticuerpos monocatenarios (Fv por ejemplo), anticuerpos quiméricos, etc., producidos por la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando tecnologías de ADN recombinante. Particularmente preferidas son las variantes de Fc como se describe en el presente documento. El término “anticuerpo” comprende adicionalmente anticuerpos policlonales y los
10 mAb que pueden ser anticuerpos agonistas o antagonistas.

Los anticuerpos de la invención se unen específicamente a receptores de Fc, como se expone en el presente documento. Por “se une específicamente” en el presente documento se entiende que los anticuerpos LC tienen una constante de unión en el intervalo de al menos 10^{-4} - 10^{-6} M⁻¹, siendo un intervalo preferido 10^{-7} - 10^{-9} M⁻¹.

- 15 En una realización preferida, los anticuerpos son humanizados. Usando tecnología actual de anticuerpos monoclonales, se puede producir un anticuerpo humanizado contra prácticamente cualquier antígeno diana que pueda identificarse [Stein, Trends Biotechnol. 15:88-90 (1997)]. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fc, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen secuencias mínimas procedentes de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos
20 humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos que forman una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, una rata o un conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de las regiones marco conservadas Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden
25 comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco conservadas importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una
30 parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Natura 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Natura 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)]. En la técnica se conocen bien métodos para la humanización de anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos de importación, que típicamente se extraen de un dominio variable de importación. La humanización puede realizarse básicamente
35 siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, supra; Riechmann *et al.*, supra; y Verhoeyen *et al.*, Science. 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo las CDR o secuencias CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En la técnica también se conocen otros ejemplos de anticuerpos monoclonales murinos humanizados, por ejemplo, anticuerpos que se unen a la proteína C humana [O'Connor *et al.*, Protein Eng. 11: 321-8 (1998)], al receptor de interleucina 2 [Queen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 86: 10029-33 (1989)] y al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano [Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 4285-9 (1992)]. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (patente de Estados Unidos N.º 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son
40 típicamente anticuerpos humanos en los que algunos de los restos de la CDR y posiblemente algunos de los restos de la FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

- En una realización preferida, los anticuerpos de la invención se basan en secuencias humanas, y por tanto se usan secuencias humanas como secuencias “base”, contra otras secuencias, tales como las secuencias de rata, de ratón y mono. Para establecer homología con la secuencia o estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de un Fc precursor o parental se compara directamente con la secuencia de Fc humana indicada en el presente documento. Después de alinear las secuencias, usando uno o más de los programas de alineamiento de homología descritos en el presente documento (por ejemplo usando restos conservados como entre especies), que permiten realizar inserciones y deleciones necesarias para mantener el alineamiento (es decir, evitando la eliminación de restos conservados a través de deleción e inserción arbitrarias), se definen los restos equivalentes a los aminoácidos
50 particulares en la secuencia primaria de la Fc humana. El alineamiento de los restos conservados debe conservar preferentemente el 100 % de dichos restos. Sin embargo, el alineamiento de más del 75 % o de tan solo el 50 % de los restos conservados es también adecuado para definir restos equivalentes (en ocasiones denominados en el presente documento “restos correspondientes”).

- 60 Los restos equivalentes también pueden definirse determinando la homología al nivel de la estructura terciaria de un fragmento Fc cuya estructura terciaria se ha determinado mediante cristalografía de rayos X. Los restos equivalentes se definen como aquellos para los cuales las coordenadas atómicas de dos o más átomos de la cadena principal de un resto de aminoácido particular del parental o precursor (N sobre N, CA sobre CA, C sobre C y O sobre O) están entre 0,13 nm y preferentemente 0,1 nm después de la alineación. La alineación se realiza después de que se haya

orientado y posicionado el mejor modelo para dar el máximo solapamiento de coordenadas atómicas de átomos de proteínas no hidrógeno del fragmento de la variante de Fc.

5 Especialmente incluidos en la definición de “anticuerpo” se encuentran los anticuerpos aglucosilados. Por “anticuerpo aglucosilado”, de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un anticuerpo que carece de hidrato de carbono unido en la posición 297 de la región Fc, en el que la numeración es conforme al sistema EU como en Kabat. El anticuerpo aglucosilado puede ser un anticuerpo desglucosilado, es decir, un anticuerpo en el que se ha retirado el hidrato de carbono de Fc, por ejemplo química o enzimáticamente. Como alternativa, el anticuerpo aglucosilado puede ser un anticuerpo no glucosilado o sin glucosilar, es decir, un anticuerpo que se expresó sin el hidrato de carbono de Fc, por ejemplo, por mutación de uno o más restos, que codifican el patrón de glucosilación o por expresión en un organismo que no une hidratos de carbono a proteínas, por ejemplo bacterias.

15 Especialmente incluidos en la definición de “anticuerpo” se encuentran los anticuerpos de longitud completa que contienen una parte de la variante de Fc. Por “anticuerpo de longitud completa” en el presente documento se entiende que es la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variable y constante. Por ejemplo, en la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, el anticuerpo de longitud completa de la clase IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y otra pesada, comprendiendo cada cadena ligera dominios de inmunoglobulina V_L y C_L, y cada cadena pesada dominios de inmunoglobulina V_H, C_γ1, C_γ2, y C_γ3. En algunos mamíferos, por ejemplo, en camélidos y llamas, los anticuerpos IgG pueden consistir solamente en dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada un dominio variable unido a la región Fc. Por “IgG” de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En seres humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

25 Por “aminoácido” e “identidad de aminoácido”, de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquiera de los análogos no naturales que pueden estar presentes en una posición definida, específica. Por “proteína” en el presente documento se entiende que es al menos dos aminoácidos unidos por enlace covalente, que incluye proteínas, polipéptidos, oligopéptidos y péptidos. La proteína puede estar constituida por aminoácidos de origen natural y enlaces peptídicos o estructuras peptidomiméticas sintéticas, es decir, “análogos”, tales como peptoides (véase Simon *et al.*, PNAS USA 89(20): 9367 (1992)) particularmente cuando los péptidos LC van administrarse a un paciente. Por tanto, “aminoácido” o “resto peptídico”, de la manera en la que se usa en el presente documento, significa aminoácidos tanto naturales como sintéticos. Por ejemplo, la homofenilalanina, la citrulina y la norleucina se consideran aminoácidos para los fines de la invención. El término “aminoácido” también incluye restos de iminoácidos tales como prolina e hidroxiprolina. La cadena lateral puede estar en configuración (R) o (S). En una realización preferida, los aminoácidos están en configuración (S) o L. Si se usan cadenas laterales de origen no natural, pueden usarse sustituyentes que no sean aminoácidos, por ejemplo, para impedir o retrasar la degradación *in vivo*.

40 Por “método de exploración computacional” en el presente documento se entiende que es cualquier método para diseñar una o más mutaciones en una proteína, utilizando dicho método un ordenador para evaluar las energías de las interacciones de las posibles sustituciones de la cadena lateral de los aminoácidos entre sí y/o con el resto de la proteína. Los expertos en la técnica apreciarán, que la evaluación de energías, lo que se denominado cálculo de energía, se refiere a algún método de puntuación de una o más modificaciones de aminoácidos. Dicho método puede implicar un término energético físico o químico, o puede implicar términos de energía basados en conocimiento, estadística, secuencias y similares. Los cálculos que componen un método de exploración computacional en el presente documento se denominan “cálculos de exploración computacional”.

45 Por “función efectora”, de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un acontecimiento bioquímico que se produce por la interacción de una región Fc de un anticuerpo con un receptor o ligando de Fc. Las funciones efectoras incluyen, pero sin limitación, ADCC, ADCP, y CDC. Por “célula efectora”, de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una célula del sistema inmunitario que expresa uno o más receptores de Fc y actúa como mediadora en una o más funciones efectoras. Las células efectoras incluyen, pero sin limitación, monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, linfocitos B, linfocitos grandes granulares, células de Langerhans, linfocitos citolíticos (NK, *natural killer*) naturales, y linfocitos T $\gamma\gamma$, y pueden ser de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Por “biblioteca”, en el presente documento, se entiende que es un conjunto de variantes de Fc de cualquier forma, incluyendo, pero sin limitación, un listado de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, o un listado de sustituciones de ácidos nucleicos o aminoácidos en posiciones variables, una biblioteca física que comprende ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca, o una biblioteca física que comprende las proteínas variantes de Fc, bien en forma purificada o no purificada.

60 Por “Fc”, “región Fc”, “polipéptido Fc”, etc., de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es a un anticuerpo, como se define en el presente documento, que incluye los polipéptidos que comprenden la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de inmunoglobulina de la región constante. Por tanto, Fc se refiere a al menos dos dominios de inmunoglobulina de la región constata de IgA, IgD, e IgG, y los tres

- últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y la bisagra flexible N-terminal de estos dominios. La región Fc de IgA y IgM puede incluir la cadena J. Para la IgG, como se ilustra en la Figura 1, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la bisagra entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, normalmente se define que la región Fc de cadena pesada de la IgG humana comprende los restos C226 o P230 en su extremo carboxilo, siendo la numeración conforme al índice EU como en Kabat. Fc puede hacer referencia a esta región cuando está aislada, o a esta región en el contexto de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o fusión de Fc. Un Fc puede ser un anticuerpo, una fusión de Fc o una proteína o dominio de proteína que comprenda Fc. Se prefieren particularmente las variantes de Fc, que son variantes de origen no natural de un Fc.
- 5 Por "fusión de Fc", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una proteína en la que uno o más polipéptidos están unidos operativamente a Fc. En el presente documento, fusión de Fc significa que es un sinónimo de los términos "inmunoadesina", "fusión de Ig", "quimera de Ig", y "globulina receptora" (algunas veces con guiones) como se usa en la técnica anterior (Chamowef *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 un compañero de fusión, que en general, puede ser cualquier proteína, incluyendo, pero sin limitación, la región de unión diana de un receptor, una molécula de adhesión, un ligando, una enzima o cualquier otra proteína o dominio de proteína. La función de la parte no Fc de una fusión de Fc es actuar como mediadora en la unión con la diana, y por tanto es funcionalmente análoga a las regiones variables de un anticuerpo.
- 10 Por "receptor Fc gamma" o "FcyRr", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es cualquier miembro de la familia de proteínas que se une a la región Fc de un anticuerpo de IgG y que está sustancialmente codificado por los genes de FcyR. En seres humanos esta familia incluye, pero sin limitación, FcyRI (CD64), incluyendo 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 FcyRIHc; y FcyRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcyRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcyRIIIb (incluyendo los alotipos FcyRIIIb-NA1 y FcyRIIIb- NA2) (Jefferis *et al.*, 2002, Immunol Lett 82: 57-65), así como cualquiera de los FcyR humanos o isoformas o alotipos de FcyR no descubiertos. Un FcyR puede ser de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los FcyR de ratón incluyen, pero sin limitación, FcyRI (CD64), FcyRII (CD32), FcyRIII (CD16), y FcyRIII-2 (CD16-2), así como cualquiera de los FcyR o isoformas o alotipos de FcyR no descubiertos.
- 20 Por "ligando de Fc", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una molécula, preferentemente un polipéptido, de cualquier organismo que se una a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo Fc-ligando. Los ligandos de Fc incluyen, pero sin limitación, los FcyR, C1q, C3, lectina de unión a manano, receptor de manosa, proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica y FcyR vírico. Los ligandos de Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.
- 25 Por "IgG", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que están sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina gamma reconocido. En seres humanos esta clase comprende IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4. En ratones esta clase comprende IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Por "inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende que es una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos. Las inmunoglobulinas pueden tener diversas formas estructurales, incluyendo, pero sin limitación anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y dominios de inmunoglobulina individuales. Por "dominio de inmunoglobulina (Ig)" en el presente documento se entiende que es a una región de una inmunoglobulina que existe como una entidad estructural distinta como constata un experto en la técnica de estructuras de proteína. Los dominios de Ig típicamente tienen una topología de plegamiento en sándwich □ característica. Los dominios de Ig conocidos en la clase de anticuerpos IgG son V_H, Cy1, Cy2, Cy3, V_L, y C_L.
- 30 Por "polipéptido parental" o "polipéptido precursor" (incluyendo parentales o precursores de Fc) de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es un polipéptido que está sustancialmente modificado para generar una variante. Dicho polipéptido parental puede ser un polipéptido de origen natural, o una variante o una versión modificada por ingeniería genética de un polipéptido de origen natural. Un polipéptido parental puede referirse al propio polipéptido, a composiciones que comprenden el polipéptido parental o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Por consiguiente, por "polipéptido Fc parental" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es un polipéptido Fc no modificado que se modifica para generar una variante, y por "anticuerpo parental" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es un anticuerpo no modificado que se modifica para generar un anticuerpo variante.
- 35 Como se ha indicado anteriormente, determinadas posiciones de la molécula Fc pueden alterarse. Por "posición" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es una localización en la secuencia de una proteína. Las posiciones pueden numerarse secuencialmente, o de acuerdo con un formato establecido, por ejemplo, conforme al índice EU como en Kabat. Por ejemplo, la posición 297 es una posición en la IgG1 del anticuerpo humano. Las posiciones correspondientes se determinan como se ha indicado anteriormente, generalmente a través del alineamiento con otras secuencias parentales.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Por "resto", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una posición en una proteína y su identidad de aminoácido asociada. Por ejemplo, la asparagina 297 (también denominada Asn297 y N297) es un resto de la IgG del anticuerpo humano.

5 Por "antígeno diana" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es la molécula que está unida específicamente por la región variable de un anticuerpo determinado. Un antígeno diana puede ser una proteína, un hidrato de carbono, un lípido o cualquier otro compuesto químico.

Por "célula diana" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es una célula que expresa un antígeno diana.

10 Por "región variable", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es la región de una inmunoglobulina que comprende uno o más dominios de Ig codificados sustancialmente por cualquiera de los genes de V_K, V_λ, y/o V_H que constituyen los locus genéticos kappa, lambda y cadena pesada de inmunoglobulina.

15 Por "polipéptido variante", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una secuencia polipeptídica que se diferencia de la de una secuencia polipeptídica parental en virtud de al menos una modificación de aminoácido. El polipéptido variante puede referirse al propio polipéptido, a una composición que comprende el polipéptido, o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica. Preferentemente, el polipéptido variante tiene al menos una modificación de aminoácido en comparación con el polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez modificaciones de aminoácidos y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos en comparación con el parental. La secuencia polipeptídica variante del presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente 80 % de homología con una secuencia polipeptídica parental, y más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de homología, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % de homología. Por consiguiente, por "variante de Fc", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una secuencia Fc que se diferencia de la de una secuencia Fc parental en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Una variante Fc puede incluir solo una región Fc o puede existir en el contexto de un anticuerpo, fusión de Fc u otro polipéptido que esté sustancialmente codificado por Fc. La variante de Fc puede referirse al propio polipéptido Fc, a composiciones que comprendan el polipéptido variante de Fc o a la secuencia de aminoácidos que lo codifica.

20 Para todas las posiciones indicadas en la presente invención, la numeración de una cadena pesada de inmunoglobulina es de acuerdo con el índice EU (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración EU de los restos del anticuerpo IgG1 humano.

25 Las variantes de Fc de la presente invención pueden optimizarse con respecto a diversas propiedades. Las propiedades que pueden optimizarse incluyen, pero sin limitación, potenciar o reducir la afinidad por un FcγR. En una realización preferida, las variantes de Fc de la presente invención se optimizan para que posean afinidad potenciada por un FcγR activador humano, preferentemente FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIc, FcγRIII a, y FcγRIII b, más preferentemente FcγRIIIa. En una realización alternativa preferida, las variantes de Fc se optimizan para que posean afinidad reducida por el receptor inhibitor humano FcγRIIb. Se espera que estas realizaciones preferidas proporcionen anticuerpos y fusiones de Fc con propiedades terapéuticas potenciadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora potenciada y una mayor fuerza anticancerosa. En una realización alternativa, las variantes de Fc de la presente invención se optimizan para que tengan afinidad reducida o anulada por un FcγR humano, incluyendo, pero sin limitación FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIc, FcγRIIIa, y FcγRIIIb. Se espera que estas realizaciones proporcionen anticuerpos y fusiones de Fc con propiedades terapéuticas potenciadas en seres humanos, por ejemplo, función efectora reducida y toxicidad reducida. Las realizaciones preferidas comprenden la optimización de la unión de Fc a un FcγR humano, sin embargo, en realizaciones alternativas, las variantes de Fc de la presente invención poseen afinidad potenciada o reducida por los FcγRs de organismos no humanos, incluyendo, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos y monos. Las variantes de Fc que se optimizan para la unión a un FcγR no humano pueden encontrar uso en experimentación. Por ejemplo, se dispone de modelos murinos para una diversidad de enfermedades que permiten realizar ensayos de propiedades tales como eficacia, toxicidad y farmacocinética para un candidato farmacológico determinado. Como se sabe en la técnica, las células cancerosas pueden injertarse o inyectarse en ratones para imitar un cáncer humano, un proceso denominado xenoinjerto. El ensayo de anticuerpos o fusiones de Fc que comprende variantes de Fc que se optimizan para uno o más FcγR de ratón, puede proporcionar información valiosa con respecto a la eficacia del anticuerpo o fusión de Fc, su mecanismo de acción y similar. Las variantes de Fc de la presente invención también pueden optimizarse para potenciar las propiedades de funcionalidad y/o solución en forma aglucosilada. En una realización preferida, las variantes de Fc aglucosiladas de la presente invención se unen a un ligando de Fc con mayor afinidad que la forma aglucosilada del polipéptido Fc parental. Dichos ligandos Fc incluyen, pero sin limitación, los FcγR, C1q, FcRn, y proteínas A y G, y pueden proceder de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación, ser humano, ratón, rata, conejo o mono, preferentemente ser humano. En una realización preferida alternativa, las variantes de Fc se optimizan para que sean más estables y/o más solubles que la forma aglucosilada del polipéptido Fc parental. Una variante de Fc que se modifica por ingeniería genética o que se predice que presenta cualquiera de las propiedades optimizadas anteriormente mencionadas se denomina en el presente documento "variante de Fc optimizada".

Las variantes de Fc de la presente invención pueden proceder de polipéptidos Fc parentales que en sí mismos provienen de una amplia serie de fuentes. El polipéptido Fc parental puede codificarse sustancialmente por uno o más genes de Fc de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación seres humanos, ratones, ratas, conejos, camellos, llamas, dromedarios, monos, preferentemente mamíferos y más preferentemente seres humanos y ratones. En una realización preferida, el polipéptido Fc parental está compuesto de un anticuerpo, denominado anticuerpo parental. El anticuerpo parental puede ser totalmente humano, obtenido por ejemplo usando ratones transgénicos (Bruggemann *et al* 1997, *Curr Opin Biotechnol* 8: 455-458) o bibliotecas de anticuerpos humanos junto con métodos de selección (Griffiths *et al.*, 1998, *Curr Opin Biotechnol* 9: 102-108). El anticuerpo parental no tiene que ser necesariamente de origen natural. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo modificado por ingeniería genética, incluyendo, pero sin limitación anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados (Clark, 2000, *Immunol Today* 21: 397-402). El anticuerpo parental puede ser una variante de un anticuerpo modificada por ingeniería genética que está sustancialmente codificada por uno o más genes de anticuerpo naturales. En una realización, el anticuerpo parental se ha madurado por afinidad, como se conoce en la técnica. Como alternativa, el anticuerpo se ha modificado de alguna otra manera, por ejemplo, como se describe en el documento USSN 10/339788, presentado el 3 de marzo del 2003.

Las variantes de Fc de la presente invención pueden estar sustancialmente codificadas por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. En una realización preferida, las variantes de Fc de la presente invención encuentran uso en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a la clase de anticuerpos de IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En una realización alternativa, las variantes de Fc de la presente invención encuentran uso en anticuerpos o fusiones de Fc que comprenden secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos IgA (incluyendo las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG, o IgM. Las variantes de Fc de la presente invención pueden comprender más de una cadena de proteína. Es decir, la presente invención puede encontrar uso en un anticuerpo o fusión de Fc que sea un monómero o un oligómero, incluyendo, un homo- o hetero- oligómero.

Las variantes de Fc de la presente invención pueden combinarse con otras modificaciones Fc, incluyendo, pero sin limitación modificaciones que alteran la función efectora. Dicha combinación puede proporcionar propiedades aditivas, sinérgicas o nuevas en los anticuerpos o fusiones de Fc. En una realización, las variantes de Fc de la presente invención pueden combinarse con otras variantes de Fc conocidas (Duncan *et al.*, 1988, *Nature* 332: 563-564; Lund *et al.*, 1991, *J Immunol* 147: 2657-2662; Lund *et al.*, 1992, *Mol Immunol* 29: 53-59; Alegre *et al.*, 1994, *Transplantation* 57: 1537-1543; Hutchins *et al.*, 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11980-11984; Jefferis *et al.*, 1995, *Immunol Lett* 44: 111-117; Lund *et al.*, 1995, *Faseb J* 9: 115-119; Jefferis *et al.*, 1996, *Immunol Lett* 54: 101-104; Lund *et al.*, 1996, *J Immunol* 157: 4963-4969; Armour *et al.*, 1999, *Eur J Immunol* 29: 2613-2624; Idusogie *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 4178-4184; Reddy *et al.*, 2000, *J Immunol* 164: 1925-1933; Xu *et al.*, 2000, *Cell Immunol* 200: 16-26; Idusogie *et al.*, 2001, *J Immunol* 166: 2571-2575; Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604; Jefferis *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65; Presta *et al.*, 2002, *Biochem Soc Trans* 30: 487-490) (documentos US 5,624,821; US 5,885,573; US 6,194,551; PCT WO 00/42072; PCT WO 99/58572). En una realización alternativa, las variantes de Fc de la presente invención se incorporan en un anticuerpo o fusión de Fc que comprende una o más glucoformas modificadas por ingeniería genética. Por "glucoforma modificada por ingeniería genética" de la manera en la que se usa en el presente documento se entiende que es una composición de hidratos de carbono que está unida mediante enlace covalente a un polipéptido Fc, en el que dicha composición de hidrato de carbono difiere químicamente de la de un polipéptido Fc parental. Las glucoformas modificadas por ingeniería genética pueden ser útiles para diversos propósitos, incluyendo pero sin limitación, potenciar o reducir la función efectora. Las glucoformas modificadas por ingeniería genética pueden generarse mediante cualquier método, por ejemplo usando cepas de expresión variantes o modificadas genéticamente, mediante la expresión simultánea con una o más enzimas, por ejemplo α 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), expresando un polipéptido Fc en diversos organismos o líneas celulares de diversos organismos o modificando uno o más hidratos de carbono después de que se haya expresado el polipéptido Fc. En la técnica se conocen métodos para generar glucoformas modificadas por ingeniería genética e incluyen, pero sin limitación (Umaia *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 176-180; Davies *et al.*, 2001, *Biotechnol Bioeng* 74: 288-294; Shieldset *al*, 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa *et al*, 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473) documentos 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, N.J.); tecnología de modificación con glucosilación GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zúrich, Suiza)). Típicamente la glucoforma modificada por ingeniería genética se refiere a los diferentes hidratos de carbono u oligosacáridos; por tanto, un polipéptido Fc, por ejemplo un anticuerpo o fusión Fc puede comprender una glucoforma modificada por ingeniería genética. Como alternativa, la glucoforma modificada por ingeniería genética puede referirse al polipéptido Fc que comprende el hidrato de carbono u oligosacárido diferente. Por tanto se contemplan combinaciones de las variantes de Fc de la presente invención con otras modificaciones de Fc, así como modificaciones de Fc no descubiertas, con el objetivo de generar nuevos anticuerpos o fusiones de Fc con propiedades optimizadas.

Las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo. Por "anticuerpo de la presente invención", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un anticuerpo que comprende una variante de Fc de la presente invención. La presente invención puede, de hecho, encontrar uso en cualquier proteína que comprenda Fc, y por tanto la aplicación de las variantes de Fc de la presente invención no

está limitadas a anticuerpos. Las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una fusión de Fc. Por "fusión de Fc de la presente invención", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es una fusión de Fc que comprende una variante de Fc de la presente invención. Las fusiones de Fc pueden comprender una variante de Fc de la presente invención unida operativamente a una citocina, a un dominio receptor soluble, a una molécula de adhesión, a un ligando, a una enzima, a un péptido u otra proteína o dominio de proteína e incluyen, pero sin limitación, las fusiones de Fc descritas en los documentos US 5.843.725; US 6.018.026; US 6.291.212; US 6.291.646; US 6.300.099; US 6.323.323; PCT WO 00/24782; y en (Chamow *et al.*, 1996, *Trends Biotechnol* 14: 52-60; Ashkenazi *et al.*, 1997, *Curr Opin Immunol* 9: 195-200).

Prácticamente, los anticuerpos y fusiones de la presente invención, pueden dirigirse a cualquier antígeno, incluyendo, pero sin limitación, la siguiente lista de proteínas, subunidades, dominios, motivos y epítomos que pertenecen a la siguiente lista de proteínas: CD2; CD3, CD3E, CD4, CD11, CD11a, CD14, CD16, CD 18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33 (proteína p67), CD38, CD40, CD40L, CD52, CD54, CD56, CD80, CD147, GD3, IL-1, IL-1R, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL- 6R, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma; TNF-alfa, TNFbeta2, TNFc, TNFalfabeta, TNF-RI, TNF-RII, FasL, CD27L, CD30L, 4-1BBL, TRAIL, RANKL, TWEAK, APRIL, BAFF, LIGHT, VEGI, OX40L, Receptor-1 de TRAIL, Receptor de Adenosina A1, Receptor de Beta de linfotóxina, TAC1, BAFF-R, EPO; LFA-3, ICAM-1, ICAM-3, EpCAM, integrina beta1, integrina beta2, integrina alfa4/beta7, integrina alfa2, integrina alfa3, integrina alfa4, integrina alfa5, integrina alfa6, integrina alfav, integrina alfaVbeta3, FGFR-3, factor de crecimiento de queratinocitos, VLA-1, VLA-4, L-selectina, anti-Ig, E-selectina, HLA, HLA-DR, CTLA-4, receptor de linfocitos T, B7-1, B7-2, VNRintegrina, TGFbeta1, TGFbeta2, eotaxina1, BlyS (estimulador de linfocitos B), complemento C5, IgE, factor VII, CD64, CBL, NCA 90, EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), factor tisular, VEGF, VEGFR, receptor de endotelina, VLA-4, hapteno NP-cap o NIP-cap, receptor alfa/beta de linfocitos T, E-selectina, digoxina, fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) y fosfatasa alcalina similar a PLAP testicular, receptor de transferrina, antígeno carcinoembrionario (CEA), CEACAM5, HMFG PEM, mucina MUC1, MUC18, Heparanasa I, miosina cardiaca humana, glucoproteína -72 asociada a tumor (TAG-72), antígeno CA 125 asociado a tumor, antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), antígeno asociado a melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA), antígeno asociado a carcinoma, glucoproteína IIB/IIIA (GP1Ib/IIIA), hidrato de carbono relacionado con Lewis Y que expresa antígeno asociado a tumor, citomegalovirus humano (HCMV), glucoproteína de envoltura gH, gp120 del VIH, HCMV, virus sincitial respiratorio RSV F, Fgp de RSVF, VNRintegrina, IL-8, antígeno tumoral asociado citoqueratinas, gp120 de Hep B, CMV, gpIIbIIIA, bucle V3 de gp120 de VIH IIIB, Fgp del virus sincitial respiratorio (RSV), glucoproteína gD del virus del herpes simple (HSV), glucoproteína gB del HSV, glucoproteína de envoltura gB del HCMV y toxina de *Clostridium perfringens*.

Un experto en la técnica apreciará que la lista de dianas anteriormente mencionada se refiere no solo a proteínas específicas y a biomoléculas, sino a la ruta bioquímica o a las rutas que las comprenden. Por ejemplo, la referencia a CTLA-4 como un antígeno diana implica que los ligandos y receptores que constituyen la ruta coestimuladora de linfocitos T, incluyendo CTLA-4, B7-1, B7-2, CD28, y cualquier otros ligandos o receptores no descubiertos que se unen a estas proteínas, también son dianas. Por tanto diana, de la manera en la que se usa en el presente documento, se refiere no solo a una biomolécula específica, sino al conjunto de proteínas que interactúan con dicha diana y a los miembros de la ruta bioquímica a la que pertenece dicha diana. Un experto en la técnica apreciará también que cualquiera de los antígenos diana anteriormente mencionados, los ligandos o receptores que se unen a los mismos u otros miembros de su ruta bioquímica correspondiente, pueden unirse operativamente a las variantes de Fc de la presente invención para generar una fusión de Fc. Por tanto, por ejemplo, una fusión de Fc que se dirige a EGFR puede construirse uniendo operativamente una variante de Fc con EGF, TGF α o a cualquier otro ligando, descubierto o no, que se una a EGFR. Por consiguiente, una variante de Fc de la presente invención podría estar unida operativamente a EGFR para generar una fusión de Fc que se una a EGF, TGF α , o a cualquier otro ligando, descubierto o no, que se una a EGRF. Por tanto, prácticamente cualquier polipéptido, bien un ligando, un receptor o cualquier otra proteína o dominio de proteína, incluyendo, pero sin limitación, las dianas anteriormente mencionadas y las proteínas que componen sus rutas bioquímicas correspondientes, pueden unirse operativamente a las variantes de Fc de la presente invención para desarrollar una fusión de Fc.

El uso de diversos anticuerpos y fusiones de Fc se ha autorizado en ensayos clínicos, o durante su desarrollo pueden beneficiarse de las variantes de Fc de la presente invención. E el presente documento dichos anticuerpos y fusiones de Fc se denominan "productos y candidatos clínicos". Por tanto en una realización preferida, las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en diversos productos y candidatos clínicos. Por ejemplo, diversos anticuerpos que se dirigen a CD20 pueden beneficiarse de las variantes de Fc de la presente invención. Por ejemplo, las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que sea sustancialmente similar a rituximab (Rituxan®, IDEC/Genentech/Roche) (véase, por ejemplo, el documento US 5.736.137), un anticuerpo anti-CD20 quimérico autorizado para tratar linfoma de No Hodgkin; HuMax-CD20, un anti-CD20 que actualmente está desarrollando Genmab, un anticuerpo anti-CD20 descrito en los documentos US 5.500.362, AME-133 (Applied Molecular Evolution), hA20 (Immunomedics, Inc.), y HumaLYM (Intracel). Diversos anticuerpos que se dirigen a miembros de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico, incluyendo EGFR (ErbB-1), Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), pueden beneficiarse de las variantes de Fc de la presente invención. Por ejemplo, las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo que sea sustancialmente similar a trastuzumab (Herceptin®, Genentech) (véase, por ejemplo, el

documento US 5.677.171), un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado autorizado para tratar el cáncer de mama; pertuzumab (rhuMab-2C4, Omnitarg™), que actualmente está desarrollando Genentech; un anticuerpo anti-Her2 descrito en el documento US 4.753.894; cetuximab (Erbix®), Imclone (documentos US 4.943.533; PCT WO 96/40210), un anticuerpo anti-EGFR quimérico en ensayos clínicos para diversos cánceres; ABX-EGF (documento US 6.235.883), que actualmente está desarrollando Abgenix/Immunex/Amgen; HuMax-EGFr (USSN 10/172,317), que actualmente está desarrollando Genmab; 425, EMD55900, EMD62000, y EMD72000 (Merck KGaA) (documento US 5558864; 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); IGR62 (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, *BrJ Cancer.* 1993, 67(2): 247-53; Modjtahedi *et al.*, 1996, *BrJ Cancer.* 73(2): 228-35; Modjtahedi *et al.*, 2003, *Int J Cancer.* 105(2): 273-80); TheraCIM hR3 (YM Biosciences, Canada and Centro de Immunología Molecular, Cuba (documentos 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/Ingeniería genética) (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) (documento PCT WO 01/88138). En otra realización preferida, las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en alemtuzumab (Campath®, Millenium), un anticuerpo monoclonal humanizado actualmente autorizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B. Las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en diversos anticuerpos o fusiones de Fc que son sustancialmente similares a otros productos y candidatos clínicos, incluyendo pero sin limitación, muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), un anticuerpo anti-CD3 desarrollado por Ortho Biotech/Johnson & Johnson, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), un anticuerpo anti-CD20 desarrollado por IDEC/Schering AG, gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg®), un anticuerpo anti-CD33 (proteína p67) desarrollado por Celltech/Wyeth, alefacept (Amevive®), una fusión de 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-TNFalfa desarrollado por Centocor, adallumab (Humira®, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Abbott, Humicade™, un anticuerpo anti-TNFalfa desarrollado por Celltech, etanercept (Enbrel®), una fusión de Fc anti-TNFalfa desarrollada por Immunex/Amgen, ABX-CBL, un anticuerpo anti-CD147 que está desarrollando Abgenix, ABX-IL8, un anticuerpo anti-IL8 que está desarrollando Abgenix, ABX-MA1, un anticuerpo anti-MUC18 que está desarrollando Abgenix, Pemtumomab (R1549,⁹⁰Y-muHMF1), un anti-MUC1 en desarrollo por Antisoma, TheraX (R1550), un anticuerpo anti-MUC1 que está desarrollando Antisoma, AngioMab (AS1405), que está desarrollando Antisoma, HuBC-1, que está desarrollado Antisoma, Tioplatino (AS1407) que está desarrollando Antisoma, Antegren® (natalizumab), un anticuerpo anti-alfa-4-beta-1 (VLA-4) y alfa-4-beta-7 que está desarrollando Biogen, mAb VLA-1, un anticuerpo anti integrina VLA-1 que está desarrollando Biogen, mAb LTBR, un anticuerpo anti-receptor beta de linfotóxina (LTBR) que está desarrollando Biogen, CAT-152, un anticuerpo anti-TGFβ2 que está desarrollando Cambridge Antibody Technology, J695, un anticuerpo anti-IL-12 que está desarrollando Cambridge Antibody Technology and Abbott, CAT-192, un anticuerpo anti-TGF/M que está desarrollando Cambridge Antibody Technology and Genzyme, CAT-213, un anticuerpo anti-Eotaxina1 que está desarrollando Cambridge Antibody Technology, LymphoStat-B™ un anticuerpo anti-Blys que está desarrollando Cambridge Antibody Technology and Human Genome Sciences Inc., TRAIL-R1mAb, un anticuerpo anti-TRAIL-R1 que está desarrollando Cambridge Antibody Technology y Human Genome Sciences, inc., Avastin™ (bevacizumab, rhuMAB-VEGF), un anticuerpo anti-VEGF que está desarrollando Genentech, un anticuerpo anti familia de receptores HER que está desarrollando Genentech, Anti-Factor Tisular (ATF), un anticuerpo anti-Factor Tisular que está desarrollando Genentech, Xolair™ (Omalizumab), un anticuerpo anti-IgE que está desarrollando Genentech, Raptiva™ (Efalizumab), un anticuerpo anti-CD11a que está desarrollando Genentech y Xoma, Anticuerpo MLN-02 (antiguamente LDP-02), que está desarrollando Genentech y Millenium Pharmaceuticals, HuMax CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollando Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está desarrollando Genmab y Amgen, HuMax-Inflam, que está desarrollando Genmab y Medarex, HuMax-Cancer, un anticuerpo anti-Heparanasa I que está desarrollando Genmab, Medarex y Oxford GcoSciences, HuMax-Linfoma, que está desarrollando Genmab y Amgen, HuMax-TAC, que está desarrollando Genmab, IDEC-131 y el anticuerpo anti-CD40L que está desarrollando IDEC Pharmaceuticals, IDEC-151 (Clenoliximab), un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollando IDEC Pharmaceuticals, IDEC-114, un anticuerpo anti-CD80 que está desarrollando IDEC Pharmaceuticals, IDEC-152, un anti-CD23 que está desarrollando IDEC Pharmaceuticals, anticuerpos anti factor de migración de macrófagos (MIF) en desarrollo en IDEC Pharmaceuticals, BEC2, un anticuerpo anti idiotípico que está desarrollando Imclone, IMC-1C11, un anticuerpo anti-KDR que está desarrollando Imclone, DC101, un anticuerpo anti-flk-1 que está desarrollando Imclone, anticuerpos anti-cadherina VE en desarrollo en Imclone, CEA-Cide™ (labetuzumab), un anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) que está desarrollando Immunomedics, LymphoCide™ (Epratuzumab), un anticuerpo anti-CD22 que está desarrollando Immunomedics, AFP-Cide, que está desarrollando Immunomedics, MyelomaCide, que está desarrollando Immunomedics, LkoCide, que está desarrollando Immunomedics, ProstaCide, que está desarrollando Immunomedics, MDX-010, un anticuerpo anti-CTLA4 que está desarrollando Medarex, MDX- 060, un anticuerpos anti-CD30 que está desarrollando Medarex, MDX-070 que está desarrollando Medarex, MDX-018 que está desarrollando Medarex, Osidem™ (IDM-1), y anticuerpo anti-Her2 que está desarrollando Medarex e Immuno-Designed Molecules, HuMax™-CD4, un anticuerpo anti-CD4 que está desarrollando Medarex y Genmab, HuMax-IL15, un anticuerpo anti-IL15 que está desarrollando Medarex y Genmab, CNTO 148, un anticuerpo anti-TNFα que está desarrollando Medarex y Centocor/J&J, CNTO 1275, un anticuerpo anti-citocina que está desarrollando Centocor/J&J, MOR101 y MOR102, anticuerpos anti-molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) (CD54) antibodies en desarrollo en MorphoSys, MOR201, un anticuerpo anti-receptor 3 del factor de crecimiento de

5 fibroblastos (FGFR-3) antibody que está desarrollando MorphoSys, Nuvion© (visilizumab), un anticuerpo anti-CD3 que está desarrollando Protein Design Labs, HuZAF™, un anticuerpo anti-interferón gamma que está desarrollando Protein Design Labs, Integrina Anti-α5β, que está desarrollando Protein Design Labs, anti-IL-12, que está desarrollando Protein Design Labs, ING-1, un anticuerpo anti-Ep-CAM que está desarrollando Xoma y MLN01, un anticuerpo anti-Beta2 integrina que está desarrollando Xoma.

10 La aplicación de las variantes de Fc en los anticuerpos anteriormente mencionados y en los productos y candidatos clínicos de la fusión de Fc no significa que esté limitada a su composición exacta. Las variantes de Fc de la presente invención pueden incorporarse en los candidatos y productos clínicos anteriormente mencionados, o en los anticuerpos y fusiones de Fc que sean sustancialmente similares a estos. Las variantes de Fc de la presente invención pueden incorporarse en versiones de los candidatos y productos clínicos anteriormente mencionados que estén humanizados, madurados por afinidad, modificados por ingeniería genética, o modificados de cualquier otra manera. Además, no es necesario usar todo el polipéptido de los productos y candidatos clínicos anteriormente mencionados para construir un nuevo anticuerpo o fusión de Fc que incorpore las variantes de Fc de la presente invención; por ejemplo, únicamente puede usarse la región variable de un producto o candidato clínico de anticuerpo, una región variable sustancialmente similar, o una versión humanizada, madurada por afinidad, modificada por ingeniería genética o modificada de la región variable. En otra realización, las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en un anticuerpo o fusión de Fc que se una al mismo epítipo, antígeno, ligando o receptor como uno de los productos y candidatos clínicos anteriormente mencionados.

20 Las variantes de Fc de la presente invención pueden encontrar uso en una amplia serie de productos de anticuerpos y fusiones de Fc. En una realización el anticuerpo o fusión de la presente invención es un compuesto terapéutico, un reactivo de diagnóstico o de investigación, preferentemente un compuesto terapéutico. Como alternativa, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención pueden usarse para usos agrícolas o industriales. En una realización alternativa, las variantes de Fc de la presente invención componen una biblioteca que puede explorarse experimentalmente. Esta biblioteca puede ser una lista de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos, o puede ser una composición física de ácidos nucleicos o polipéptidos que codifiquen las secuencias de la biblioteca. La variante de Fc puede encontrar uso en una composición de anticuerpos que sea monoclonal o policlonal. En una realización preferida, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se usan para destruir células diana que portan el antígeno diana, por ejemplo, células cancerosas. En una realización alternativa, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana, por ejemplo, para antagonizar una citocina o un receptor de citocina. En una realización preferida alternativa, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se usan para bloquear, antagonizar o agonizar el antígeno diana para destruir las células diana que portan el antígeno diana.

35 Las variantes de Fc de la presente invención pueden usarse para diversos fines terapéuticos. En una realización preferida, las proteínas variantes de Fc se administran a un paciente para tratar un trastorno relacionado con anticuerpos. Un "paciente", para los fines de la presente invención, incluye tanto seres humanos como otros animales, preferentemente mamíferos y más preferentemente seres humanos. Por tanto, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención tienen aplicaciones tanto veterinarias como de terapia humana. En la realización preferida el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida el paciente es un ser humano. El término "tratamiento" en la presente invención significa incluir tratamiento terapéutico, así como profiláctico o medidas supresoras para una enfermedad o trastorno. Por tanto, por ejemplo, la administración satisfactoria de un anticuerpo o fusión de Fc antes de la aparición de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro ejemplo, la administración satisfactoria de un anticuerpo o fusión de Fc optimizado después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad, comprende el tratamiento de la misma. "Tratamiento" también incluye la administración de un anticuerpo o proteína de fusión de Fc optimizado después de la aparición de la enfermedad para erradicar la misma. La administración satisfactoria de un agente después de haber aparecido y de haberse desarrollado los síntomas clínicos, con posible reducción de los síntomas clínicos y quizás la mejoría de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "que necesitan tratamiento" incluyen mamíferos que ya tienen la enfermedad o el trastorno, así como los propensos a tener la enfermedad o trastorno, incluyendo aquellos en los que la enfermedad o el trastorno deben prevenirse. En el presente documento, por "trastorno relacionado con anticuerpos" o "trastorno sensible a anticuerpos" o "afección" o "enfermedad" se entiende un trastorno que puede mejorarse a través de la administración de una composición farmacéutica que comprenda un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención. Los trastornos relacionados con anticuerpos incluyen, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inmunológicas, enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias, enfermedades neurológicas y enfermedades oncológicas y neoplásicas incluyendo cáncer. En el presente documento, "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o neoplasias malignas linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga,

hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer tiroideo, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, carcinoma testicular, cáncer esofágico, tumores de tracto biliar así como cáncer de cabeza y cuello. Además, las variantes de Fc de la presente invención pueden usarse para tratar afecciones que incluyen, pero sin limitación, insuficiencia cardiaca congestiva (CHF), vasculitis, rosácea, acné eczema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de médula ósea; pérdida de hueso; enfermedad de Paget, osteoclastoma; mieloma múltiple; cáncer de mama; osteopenia difusa; malnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis de células de Langerhans, lesión de médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa polioestótica, reconstrucción periodontal y fracturas de hueso; sarcoidosis; mieloma múltiple; cánceres osteolíticos de hueso, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, tratamiento del dolor de huesos e hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplante, infecciones víricas, neoplasias hematológicas y afecciones neoplásicas similares, por ejemplo, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño /leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, enfermedad de células del manto, linfoma folicular, linfoma de linfocitos B grandes difusos, linfoma de zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmacítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluyendo leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B/linfoma y leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T/linfoma, timoma, tumores de linfocitos citolíticos y linfocitos T maduros, incluyendo leucemias de linfocitos T periféricos, leucemia de linfocitos T adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides, tales como leucemias mielógenas agudas, incluyendo AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, incluyendo leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular, uterino, vaginal o cánceres de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado primario o cáncer endometrial y tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma), osteoporosis, hepatitis, VIH, SIDA, espondiloartritis, artritis reumatoide, enfermedades intestinales inflamatorias (IBD), septicemia y choque séptico, enfermedad de Crohn, psoriasis, escleroderma, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), rechazo de injerto alogénico de islotes, neoplasias malignas hematológicas, así como mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico (MDS) y leucemia mielógena aguda (AML), inflamación asociada con tumores, lesión de nervios periféricos o enfermedades desmielinizantes.

En una realización, un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención se administra a un paciente que tiene una enfermedad que implica una expresión inapropiada de una proteína. Dentro del ámbito de la presente invención esto significa que se incluyen enfermedades y trastornos caracterizados por proteínas aberrantes, debido, por ejemplo, a alteraciones en la cantidad de una proteína presente, a la presencia de una proteína mutante o a ambas cosas. Un exceso de abundancia puede deberse a cualquier causa, incluyendo, pero sin limitación, una sobreexpresión a nivel molecular, una aparición prolongada o acumulada en el sitio de acción, o una actividad aumentada de una proteína con respecto a la actividad normal. En esta definición se incluyen enfermedades y trastornos caracterizados por una reducción de una proteína. Esta reducción puede deberse a cualquier causa, incluyendo, pero sin limitación, una expresión reducida a nivel molecular, una aparición breve o reducida en el sitio de acción, formas mutantes de una proteína, o a una actividad disminuida de una proteína con respecto a la actividad normal. Dicho exceso de abundancia o reducción de una proteína puede medirse con respecto a la expresión, a la aparición o a la actividad normal de una proteína y dicha medición puede desempeñar una función importante en el desarrollo y/o ensayo clínico de los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención.

En una realización, un anticuerpo o una fusión de Fc de la presente invención es el único agente terapéuticamente activo que se administra a un paciente. Como alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc de la presente invención se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos distintos, incluyendo, pero sin limitación, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, citocinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes antihormonales, inhibidores de quinasa, agentes antiangiogénicos, agentes cardioprotectores u otros agentes terapéuticos. Dichas moléculas están convenientemente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad que se desea. El médico tratante experto puede determinar empíricamente la dosis, o las dosis, apropiadas de otros agentes terapéuticos útiles en el presente documento. Los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención pueden administrarse simultáneamente con uno o más regímenes terapéuticos distintos. Por ejemplo, un anticuerpo o una fusión de Fc de la presente invención pueden administrarse al paciente junto con quimioterapia, radioterapia o tanto con quimioterapia como con radioterapia. En una realización, el anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención pueden administrarse junto con uno o más anticuerpos o fusiones de Fc, que pueden comprender, o no, una variante de Fc de a presente invención.

En una realización, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se administran con un agente quimioterapéutico. Por "agente quimioterapéutico", de la manera en la que usa en el presente documento, se entiende que es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclosfosfamida (CITOXAN™); alquil sulfonatos, tales como, busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas, tales como, benzodopa, carboquona,

meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamida, trietilenotiofosforamida y trimetilomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, cilofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomicinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6- diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, pronionato de dromostanolona, epitioestano, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frofínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptino; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofuran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacitósina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Miers Squibb Oncologi, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino, tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinóico; esperamicinas; capecitabina; inhibidor de timidilato sintasa (tal como Tomudex); inhibidores de cox-2, tales como celicoxib (CELEBREX®) o MK-0966 (VIOXX®); y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los compuestos anteriores farmacéuticamente aceptables. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal en tumores tales como antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los compuestos anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un agente quimioterapéutico u otro agente citotóxico puede administrarse como un profármaco. Por "profármaco", de la manera en la que se usa en el presente documento, significa que es una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y que puede activarse o transformarse enzimáticamente en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615^o Meeting Belfast, 14:375-382; y Stella *et al* "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt *et al.*, (ed.): 247-267, Humana Press, 1985. Los profármacos que pueden usarse con la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen beta lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina u otros de 5-fluorouridina que pueden transformarse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma profarmacológica para su uso con los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los agentes quimioterapéuticos mencionados anteriormente.

Los anticuerpos y las fusiones de Fc de la presente invención pueden combinarse con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, en una realización, el paciente que va a tratarse con el anticuerpo o con la fusión de Fc también puede recibir radioterapia. La radioterapia puede administrarse de acuerdo con protocolos normalmente empleados en la técnica y conocidos por el experto en la materia. Dicha terapia incluye, pero sin limitación, radiación con cesio, iridio, yodo o cobalto. La radioterapia puede ser radiación de todo el organismo o puede dirigirse localmente a un sitio o a un tejido específico en el organismo, o sobre el mismo, tal como el pulmón, la vejiga o la próstata. Típicamente, la radioterapia se administra en impulsos durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 a 2 semanas. Sin embargo, la radioterapia puede administrarse durante periodos de tiempo más prolongados. Por ejemplo, la radioterapia puede administrarse a pacientes que tienen cáncer de cabeza y cuello durante aproximadamente de 6 a aproximadamente 7 semanas. Opcionalmente, la radioterapia puede administrarse como una sola dosis o como dosis múltiples, secuenciales. El experto médico puede determinar empíricamente la dosis, o las dosis, de radioterapia apropiadas que son útiles en el presente documento. De acuerdo con otra realización de la divulgación, para tratar las células cancerosas *ex vivo* se emplea el anticuerpo o la fusión de Fc de la presente invención y una o más terapias contra el cáncer. Se contempla que dicho tratamiento *ex vivo* puede ser útil en el trasplante de médula ósea y, particularmente, en el trasplante autólogo de médula ósea. Por ejemplo, puede emplearse el tratamiento de células o tejidos que contienen células cancerosas con anticuerpos o fusiones de Fc y con una o más terapias contra

el cáncer, tales como las descritas anteriormente, para reducir o reducir sustancialmente las células cancerosas antes del trasplante en un paciente receptor. Por supuesto se contempla que los anticuerpos y las fusiones de Fc de la invención puedan emplearse en combinación incluso con otras técnicas terapéuticas tales como cirugía.

En una realización alternativa, los anticuerpos y las fusiones de Fc de la presente invención se administran con una citocina. Por "citocina", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Como ejemplos de dichas citocinas se encuentran las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citocinas se encuentran la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humano, la hormona N-metionil del crecimiento humano, y la hormona del crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glucoproteicas, tales como, hormona estimuladora de folículos (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina; lactógeno placentario; factor alfa y beta de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mülleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; actividina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-beta; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-alfa y TGF-beta; factor I y II de crecimiento insulínico; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-alfa, beta y gamma; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (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 necrosis tumoral tal como TNF-alfa o TNF-beta; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes, y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

Diversos otros agentes terapéuticos pueden encontrar uso para la administración con los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención. En una realización, el anticuerpo o la fusión de Fc se administra con un agente antiangiogénico. Por "agente antiangiogénico", de la manera en la que se usa en el presente documento, se entiende que es un compuesto que bloquea el desarrollo de vasos sanguíneos, o que interfiere hasta cierto grado, con dicho desarrollo. El factor antiangiogénico puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña o una proteína, por ejemplo un anticuerpo, una fusión de Fc o una citocina, que se une a un factor de crecimiento o a un receptor del factor de crecimiento implicado en la promoción de la angiogénesis. El factor de crecimiento antiangiogénico preferido en el presente documento es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En una realización alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc se administran con un agente terapéutico que induce o potencia la respuesta inmunitaria adaptativa, por ejemplo, un anticuerpo que se dirige a CTLA-4. En una realización alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc se administran con un inhibidor de tirosina quinasa. Por "inhibidor de tirosina quinasa", de la manera en la que se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que inhibe, hasta cierto grado, la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa. Los ejemplos de dichos inhibidores incluyen, pero sin limitación, quinazolininas, tales como PD 153035, 4-(3-cloroanilino) quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, tales como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino)-7H-pirrolo(2,3-d) pirimidinas; curcumina (diferuloil metano, 4,5-bis (4-fluoroanilino)ftalimida); tirfostinas que contienen restos de nitrofenilo; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo, las que se unen a ácido nucleico que codifica ErbB); quinoxalinas (documento US 5.804.396); trifostinas (documento US 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering A G); inhibidores de pan-ErbB tales como C1-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); mesilato de imatinib (STI571, Gleevec®; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); C1- 1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: US 5.804.396; PCT WO 99/09016 (American Cyanamid); PCT WO 98/43960 (American Cyanamid); PCT WO 97/38983 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06378 (Warner-Lambert); PCT WO 99/06396 (Warner-Lambert); PCT WO 96/30347 (Pfizer, Inc); PCT WO 96/33978 (AstraZeneca); PCT W096/3397 (AstraZeneca); PCT WO 96/33980 (AstraZeneca), gefitinib (IRESSA™, ZD1839, AstraZeneca) y OSI-774 (Tarceva™, OSI Pharmaceuticals/Genentech).

En una realización alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc de la presente invención está conjugado o unido operativamente a otro compuesto terapéutico. El compuesto terapéutico puede ser un agente citotóxico, un agente quimioterapéutico, una toxina, un radioisótopo, una citocina u otro agente terapéuticamente activo. Los conjugados del anticuerpo o fusión de Fc y el agente citotóxico pueden prepararse usando diversos agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexan-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tal como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tal como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5- difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta et al., 1971, Science 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase el documento PCT WO 94/11026. El enlazador puede ser un enlazador escindible que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un

enlazador ácido lábil, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52: 127-131). Como alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc está unido operativamente al agente terapéutico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica.

5 Los agentes quimioterapéuticos que pueden ser útiles para la conjugación con los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se han descrito anteriormente. En una realización alternativa, el anticuerpo o la fusión de Fc se
 10 conjuga o se une operativamente a una toxina, incluyendo, pero sin limitación, toxinas de molécula pequeña y toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Las toxinas de molécula pequeña incluyen, pero sin limitación, calicamicina, maitansina (documento
 15 US 5.208.020), tricoteno y CC1065. En una realización de la divulgación, el anticuerpo o fusión de Fc se conjuga con una o más moléculas de maitansina (por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 moléculas de maitansina por molécula de anticuerpo). La maitansina puede convertirse, por ejemplo, en Mai-SS-Me que puede
 20 reducirse a Mai-SH3 y reaccionar con el anticuerpo modificado o con la fusión de Fc modificada (Chari et al., 1992, *Cancer Research* 52: 127-131) para generar un conjugado anticuerpo - maitansinoide o fusión de Fc - maitansinoide. Otro conjugado de interés comprende un anticuerpo o fusión de Fc conjugado con una o más moléculas de
 25 calicamicina. La familia de antibióticos de la calicamicina puede producir roturas de ADN bicatenario a concentraciones sub-picomolares. Los análogos estructurales de la calicamicina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 , (Hinman et al., 1993, *Cancer Research* 53: 3336-3342; Lode et al., 1998, *Cancer Research* 58: 2925-2928) (documentos US 5.714.586; US 5.712.374; US 5.264.586; US 5.773.001). Diez análogos de dolastatina, tales como auristatina E (AE) y monometilauristatina E (MMAE) pueden
 30 usarse como conjugados para las variantes de Fc de la presente invención (Doronina et al., 2003, *Nat Biotechnol* 21 (7): 778-84; Francisco et al., 2003 *Blood* 102(4): 1458-65). Las toxinas útiles enzimáticamente activas incluyen, pero sin limitación, la cadena A de la difteria, fragmentos activos de no unión de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modicina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento PCT WO 93/21232. La presente divulgación contempla adicionalmente un conjugado o una fusión, formado entre un anticuerpo o una fusión de Fc de la presente invención y un compuesto con actividad nucleolítica, por ejemplo, una ribonucleasa o ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa (DNasa).

30 En una realización alternativa, un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención puede conjugarse o unirse operativamente a un radioisótopo para formar un radioconjugado. Se dispone de diversos isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados y fusiones de Fc. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , e isótopos radioactivos de Lu.

35 Incluso en otra realización, un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención pueden conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el predireccionamiento tumoral, en el que el conjugado anticuerpo-receptor o fusión de Fc-receptor se administra al paciente, seguido de la retirada del conjugado no unido de la circulación usando un agente eliminador y después administrando un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se
 40 conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido). En una realización alternativa, el anticuerpo o fusión de Fc se conjuga o está unido operativamente a una enzima para emplear terapia profarmacológica mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT). La ADEPT puede usarse conjugando o uniendo operativamente el anticuerpo o la fusión de Fc con una enzima activadora de profármaco que transforma un profármaco (por ejemplo un agente peptídico quimioterapéutico, véase el documento PCT WO 81/01145) en un fármaco activo contra el
 45 cáncer. Véanse, por ejemplo, los documentos PCT WO 88/07378 y US 4.975.278. El componente enzimático del inmunconjugado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal manera que lo transforme en su forma citotóxica, más activa. Las enzimas que son útiles en el método de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, fosfatasa alcalina, útil para la transformación de profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para la transformación de profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para la transformación de 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco contra el cáncer, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasas de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para la transformación de profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para la transformación de profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como beta-galactosidasa y neuramimidasa útiles para transformar profármacos glucosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para transformar grupos derivatizados con alfa-lactamas en fármacos libres; y amidasas de penicilina, tales como amidasa de penicilina V o amidasa de penicilina G, útiles para transformar fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxilacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para transformar los profármacos de la divulgación en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, 1987, *Nature* 328: 457458). Para la administración de la abzima a una población de células tumorales pueden prepararse conjugados de anticuerpo-abzima y conjugados de fusión de Fc-abzima. En el presente documento se presentan otras modificaciones de los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo o fusión de Fc pueden unirse a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y propilenglicol.

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formula un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención y uno o más agentes terapéuticamente activos. Las formulaciones de los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención se preparan para su conservación mezclando dicho anticuerpo o fusión de Fc, que tiene el grado de pureza deseado, con transportadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los transportadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3- pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas, tal como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; cargas tales como celulosa microcristalina, lactosa, almidones de maíz y otros; agentes aglutinantes; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una realización preferida, la composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la fusión de Fc de la presente invención es una forma hidrosoluble, tal como la que se presenta como sales farmacéuticamente aceptables, lo que significa que incluye sales de adicción de ácidos y de bases. La expresión "sal de adicción de ácidos farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que conservan la eficacia biológica de las bases libres y que son, desde un punto de vista biológico, o desde cualquier otro punto de vista, deseables, y están formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adicción de bases farmacéuticamente aceptables" incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, de aluminio y similares. Particularmente preferidas son las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases no tóxicas orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a usar para la administración *in vivo* son preferentemente estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles o de cualquier otro método.

Los anticuerpos y fusiones de Fc desvelados en el presente documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que es útil para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen el anticuerpo o la fusión Fc se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA*, 82: 3688; Hwang *et al.*, 1980, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77: 4030; US 4.485.045; US 4.544.545; y PCT WO 97/38731. En el documento US 5.013.556 se desvelan liposomas con tiempo de circulación potenciado. Los componentes de los liposomas se disponen normalmente en una formación bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas particularmente útiles pueden generarse mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Opcionalmente, en el liposoma se incluye un agente quimioterapéutico u otro agente terapéuticamente activo (Gabizon *et al.*, 1989, *J National Cancer Inst* 81: 1484).

Los anticuerpos, fusiones de Fc y otros agentes terapéuticamente activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas por métodos, incluyendo, sin limitación, técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina, o microcápsulas de poli-(metilmetacrilato)), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocapsulas) y macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed., 1980. Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, cuyas matrices tienen forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o alcohol poli(vinílico)), polilactidas (documento US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico o gamma etil-L-glutamato, etilen-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tal como LUPRON DEPOT™ (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico y ProLease® (disponible en el comercio de Alkermes), que es un sistema de liberación basado en microesferas compuesto por la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-D,L-lactida-co-glicolida (PLG).

La concentración del anticuerpo o fusión de Fc terapéuticamente activo de la presente invención en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100 % en peso. En una realización preferida, la concentración del anticuerpo o fusión de Fc está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Para tratar a un paciente, se le puede administrar una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención. En el presente documento, por “dosis terapéuticamente eficaz” se entiende que es una dosis que produce los efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y la determinará un experto en la materia usando técnicas conocidas. Las dosificaciones pueden variar de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal o pueden ser más altas, por ejemplo 0,1, 1, 10 o 50 mg/kg de peso corporal, prefiriéndose de 1 a 10 mg/kg. Como se sabe en la técnica, puede ser necesario realizar ajustes en función de la degradación del anticuerpo o fusión de Fc, de la administración localizada frente a la sistémica y de la tasa de síntesis de nuevas proteasas, así como de la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción con fármacos y de la gravedad de la afección, y se determinarán con experimentación habitual por los expertos en la técnica.

La administración de la composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención, preferentemente en forma de una solución acuosa estéril, puede realizarse de diversas maneras incluyendo, pero sin limitación, administración oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóptica, transdérmica, tópica (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar (por ejemplo, tecnología AERx® inhalable disponible en el comercio de Aradigm, o Inhance™ un sistema de administración pulmonar disponible en el comercio de Inhale Therapeutics), vaginal, parenteral, rectal o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., el anticuerpo o fusión de Fc puede aplicarse directamente como una solución o pulverización. Como se sabe en la técnica, la composición farmacéutica puede formularse de acuerdo con esto, dependiendo de la manera en la que se introduzca.

Métodos de modificación por ingeniería genética

La presente divulgación proporciona métodos de modificación por ingeniería genética que pueden usarse para generar variantes de Fc. Un obstáculo principal que ha impedido intentos previos a la modificación por ingeniería genética de Fc es que solo han sido posibles intentos al azar en la modificación, debido en parte a la ineficacia de las estrategias y de los métodos de modificación por ingeniería genética, y a la naturaleza de producción y exploración de bajo rendimiento del anticuerpo. La presente divulgación describe métodos de modificación por ingeniería genética que superan estos inconvenientes. Se contempla una diversidad de estrategias de diseño, métodos de exploración computacional, métodos de generación de bibliotecas y métodos de producción y exploración experimentales. Estas estrategias, enfoques, técnicas y métodos pueden aplicarse individualmente o en diversas combinaciones para modificar variantes de Fc optimizadas.

Estrategias de diseño

La estrategia más eficaz para generar variantes de Fc que se optimizan para una propiedad deseada es dirigir los esfuerzos de modificación por ingeniería genética hacia un objetivo. Por consiguiente, la presente divulgación enseña estrategias de diseño que pueden usarse para optimizar por ingeniería genética variantes de Fc. El uso de una estrategia de diseño significa guiar las modificaciones por ingeniería genética de Fc, pero no significa limitar una variante de Fc a una propiedad particular optimizada basándose en la estrategia de diseño que se usó para modificarla. A primera vista esto puede parecer contradictorio; sin embargo, su validez procede de la enorme complejidad de sutiles interacciones que determinan la estructura, estabilidad, solubilidad, y la función de las proteínas y complejos de proteína-proteína. Aunque se han hecho esfuerzos para predecir qué posiciones, restos, interacciones, etc. de las proteínas son importantes, algunas veces críticos, para un objeto de diseño, estos no son predecibles. A menudo los efectos sobre la estructura, estabilidad, solubilidad y función de las proteínas, ya sean favorables o desfavorables, son imprevistos. Incluso hay innumerables modificaciones de aminoácidos que son perjudiciales o nocivas para las proteínas. Por tanto a menudo la mejor estrategia para modificar por ingeniería genética procede de la generación de variantes de proteínas que se centran generalmente hacia un objetivo de diseño pero que no causan efectos perjudiciales. De esta manera, un objetivo principal de una estrategia de diseño puede ser la generación de una diversidad de calidad. A un nivel más simplista esto puede pensarse como llevar todas las de ganar a favor de uno. Como un ejemplo, la perturbación del hidrato de carbono o de un ángulo particular de dominio-dominio de Fc, como se describe más adelante, son estrategias de diseño válidas para generar variantes de Fc optimizadas, a pesar del hecho de que no se entiende bien cómo los hidratos de carbono y los ángulos de dominio-dominio determinan las propiedades de Fc. Reduciendo el número de modificaciones de aminoácidos perjudiciales que se exploran, es decir, explorando la diversidad de calidad, estas estrategias de diseño se vuelven prácticas. Por tanto el verdadero valor de las estrategias de diseño pensadas en la presente divulgación es su capacidad para dirigir esfuerzos de modificación por ingeniería genética hacia la generación de variantes de Fc valiosas. El valor específico de una cualquiera de las variantes resultantes se determina después de experimentación.

Se proporciona una estrategia de diseño para la modificación de variantes de Fc por ingeniería genética en la que la interacción de Fc con algún ligando de Fc se altera modificando por ingeniería genética aminoácidos en la interfaz entre Fc y dicho ligando de Fc. Los ligandos Fc del presente documento pueden incluir, pero sin limitación, los FcγR, C1q, FcRn, la proteína A o G, y similar. Explorando sustituciones energéticamente favorables en las posiciones de Fc que impactan en la interfaz de unión, puede modificarse variantes por ingeniería genética que muestren nuevas

- conformaciones de interfaz, algunas de las cuales pueden mejorar la unión con el ligando de Fc, algunas de las cuales pueden reducir la unión con el ligando de Fc y algunas de las cuales pueden tener otras propiedades favorables. Dichas nuevas conformaciones de interfaz podrían ser el resultado, por ejemplo, de una interacción directa con restos del ligando de Fc que forman la interfaz, o de efectos indirectos causados por modificaciones de aminoácidos tales como perturbación de conformaciones de la cadena principal o lateral. Las posiciones variables pueden seleccionarse como cualquiera de las posiciones que se considere que desempeñan una función importante en la determinación de la conformación de la interfaz. Por ejemplo, pueden seleccionarse posiciones variables como el conjunto de restos que se encuentran dentro de una determinada distancia, por ejemplo 5 Angstroms (Å), preferentemente entre 1 y 10 Å, de cualquier resto que establezca contacto directo con el ligando de Fc.
- 5 Se proporciona una estrategia de diseño adicional para generar variantes de Fc en la que la conformación del hidrato de carbono de Fc en N297 se optimiza. Como se usa en este contexto, optimización significa incluir cambios conformacionales y composicionales en el hidrato de carbono N297 que dan como resultado una propiedad deseada, por ejemplo, un aumento o una reducción de la afinidad por un FcγR. Dicha estrategia está confirmada por la observación de que la estructura y conformación del hidrato de carbono afecta drásticamente a la unión de Fc/FcγR y Fc/C1q (Umana *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.*, 2002, *J Biol Chem* 277: 26733-26740; Shinkawa *et al.*, 2003, *J Biol Chem* 278: 3466-3473). Sin embargo, el hidrato de carbono no establece contacto específico con los FcγR. Explorando sustituciones energéticamente favorables en posiciones que interaccionen con el hidrato de carbono, a través de ingeniería genética puede modificarse una diversidad de variantes de calidad que muestreen nuevas conformaciones de hidratos de carbono, algunas de las cuales puede mejorar y alguna de las cuales puede reducir la unión a uno o más ligandos de Fc. Aunque la mayor parte de las mutaciones cerca de la interfaz Fc/hidrato de carbono parecen alterar la conformación del hidrato de carbono, se ha observado que algunas mutaciones alteran la composición de la glucosilación (Lund *et al.*, 1996, *J Immunol* 157: 4963-4969; Jeffens *et al.*, 2002, *Immunol Lett* 82: 57-65).
- 10 Se proporciona otra estrategia de diseño para generar variantes de Fc en la que se optimiza el ángulo entre los dominios Cy2 y Cy3. Como se usa en este contexto, optimización significa describir cambios conformacionales en el ángulo de dominio entre Cy2 y Cy3 que dan como resultado una propiedad deseada, por ejemplo, un aumento o una reducción de la afinidad por un FcγR. Este ángulo es un determinante de afinidad de Fc/FcγR importante (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483) y diversas mutaciones distales a la interfaz de Fc/FcγR afectan posiblemente a la unión modulándola (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604). Explorando posiciones de sustituciones energéticamente favorables que parecen desempeñar una función clave en la determinación del ángulo entre Cy2 y Cy3 y la flexibilidad de los dominios uno con respecto al otro, puede diseñarse una diversidad de variantes de calidad que muestree nuevos ángulos y niveles de flexibilidad, algunos de los cuales pueden optimizarse para una propiedad de Fc deseada.
- 15 Se proporciona otra estrategia de diseño para generar variantes de Fc en la que la Fc se vuelve a modificar por ingeniería genética para eliminar la dependencia estructural y funcional sobre la glucosilación. Esta estrategia de diseño implica la optimización de la estructura, estabilidad, solubilidad y/o función de Fc (por ejemplo afinidad de Fc por uno o más ligandos de Fc) en ausencia del hidrato de carbono N297. En una estrategia, las posiciones se exponen para resolver la ausencia de glucosilación se modifican por ingeniería genética de tal manera que sean estables, estructuralmente coherentes con la estructura de Fc y sin tendencia a agregarse. El Cy2 es único dominio de Ig desparejado en el anticuerpo (véase la Figura 1). Por tanto, el hidrato de carbono N297 tapa el parche hidrófobo expuesto que podría ser normalmente la interfaz de una interacción entre proteína-proteína con otro dominio Ig, manteniendo la estabilidad e integridad estructural de Fc e impidiendo la agregación de los dominios Cy2 a través del eje central. Las estrategias de optimización de Fc aglucosilado pueden implicar, pero sin limitación, diseñar modificaciones de aminoácidos que potencien la estabilidad y/o la solubilidad de Fc aglucosilado incorporando restos polares y/o con carga que se orientan hacia el interior del eje del dímero Cy2- Cy2 y diseñar modificaciones de aminoácidos que potencian directamente la interfaz de Fc/FcγR aglucosilada o la interfaz de Fc aglucosilado con algún otro ligando de Fc.
- 20 Se proporciona una estrategia de diseño adicional para modificar variantes de Fc por ingeniería genética en la que se optimiza la conformación del dominio Cy2. Como se usa en este contexto, optimización significa describir cambios conformacionales en el ángulo del dominio Cy2 que se da como resultado una propiedad deseada, por ejemplo, un aumento o una reducción de la afinidad por un FcγR. Explorando sustituciones energéticamente favorables en las posiciones Cy2 que impactan en la conformación de Cy2, a través de ingeniería genética puede modificarse una diversidad de variantes de calidad que muestreen nuevas conformaciones de Cy2, algunas de las cuales pueden conseguir el objetivo del diseño. Dichas nuevas conformaciones de Cy2 pueden ser el resultado, por ejemplo, de conformaciones estructurales alternativas que se muestrean con la variante. Las posiciones variables pueden seleccionarse como cualquiera de las posiciones que se piense que desempeñan una función importante en la determinación de la estructura, estabilidad, solubilidad, flexibilidad, función, y similar, de Cy2. Por ejemplo, restos núcleo hidrófobos de Cy2, es decir, restos de Cy2 que están parcial o completamente secuestrados del disolvente, pueden volver a modificarse por ingeniería genética. Como alternativa, pueden considerarse restos no núcleo o restos que parezcan ser importantes para determinar la estructura, estabilidad o flexibilidad de la cadena principal.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

Se proporciona una estrategia de diseño adicional para la optimización de Fc en la que la unión a un complemento Fc γ R, o a algún otro ligando de Fc se altera mediante modificaciones que modulan la interacción electrostática entre Fc y dicho ligando de Fc. Dichas modificaciones pueden considerarse como la optimización del carácter electrostático global de Fc, e incluyen el reemplazo de aminoácidos neutros por un aminoácido con carga, el reemplazo de un aminoácido con carga por un aminoácido neutro o el reemplazo de un aminoácido con carga por un aminoácido de carga opuesta (es decir, carga inversa). Dichas modificaciones pueden usarse para efectuar cambios en la afinidad de unión entre un Fc y uno o más ligandos de Fc, por ejemplo, los Fc γ R. En una realización preferida, se seleccionan posiciones en las que la unión podría estar afectada por sustituciones electrostáticas usando uno de los diferentes métodos bien conocidos para el cálculo de potenciales electrostáticos. En la realización más sencilla, se usa la ley de Coulomb para generar potenciales electrostáticos en función de la posición en la proteína. Otras realizaciones incluyen el uso de la escala de Debye-Huckel para explicar los efectos de la fuerza iónica, y en realizaciones más sofisticadas cálculos tales como lo de Poisson-Boltzman. Dichos cálculos electrostáticos pueden poner de relieve posiciones y sugerir modificaciones de aminoácidos específicas para conseguir el objetivo del diseño. En algunos casos, puede esperarse que estas sustituciones afecten de manera variable a la unión de diferentes ligandos de Fc, por ejemplo, para potenciar la unión con los Fc γ R activadores disminuyendo al mismo tiempo la afinidad de unión por los Fc γ R inhibidores.

Exploración computacional

Un obstáculo principal para la obtención de variantes de Fc valiosas es la dificultad para predecir qué modificaciones de aminoácidos, de entre el enorme número de posibilidades, lograrán los objetivos deseados. De hecho, una de las principales razones por las que los intentos anteriores de diseño por ingeniería genética de Fc han fallado en la producción de variantes de Fc de valor clínico significativo es que las estrategias para modificar por ingeniería genética a Fc han implicado hasta ahora estrategias de acierto o error. La presente divulgación proporciona métodos de exploración computacional que permiten un diseño por ingeniería genética cuantitativo y sistemático de variantes de Fc. Estos métodos usan típicamente funciones de puntuación a nivel atómico, muestreo de rotámeros de cadena lateral, y métodos de optimización avanzados para captar de manera precisa las relaciones entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas. La exploración computacional permite la exploración del espacio de posibilidades de la secuencia completa en posiciones diana filtrando la gran diversidad resultante. Las bibliotecas de variantes que se exploran computacionalmente están enriquecidas de manera eficaz para secuencias estables, plegadas adecuadamente, y funcionales, permitiendo una optimización activa de Fc para un objetivo deseado. Debido a las restricciones de secuencia solapantes en la estructura, estabilidad, solubilidad y función de las proteínas, un gran número de candidatos en una biblioteca ocupa espacio de secuencia "desperdiciado". Por ejemplo, una gran parte del espacio de secuencia codifica proteínas no plegadas, mal plegadas, plegadas de manera incompleta, parcialmente plegadas o agregadas. Esto es particularmente relevante para el diseño por ingeniería genética de Fc debido a que los dominios de Ig son estructuras de beta lámina pequeñas, cuyo diseño ha demostrado ser extremadamente complicado (Quinn *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8747-8751; Richardson *et al.*, 2002, *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2754-2759). Incluso sustituciones aparentemente inofensivas en la superficie de una beta lámina pueden provocar conflictos de empaquetamiento graves, alterando dramáticamente el equilibrio de plegado (Smith *et al.*, 1995, *Science* 270:980-982); casualmente, la alanina es uno de los peores formadores de beta lámina (Minor *et al.*, 1994, *Natura* 371:264-267). Los determinantes de la estabilidad y especificidad de la beta lámina son un delicado equilibrio entre un gran número de interacciones sutiles. La exploración computacional permite la generación de bibliotecas que están compuestas principalmente de espacio de secuencia productivo, y por consiguiente aumenta las posibilidades de identificar proteínas que están optimizadas para el objetivo de diseño. De hecho, la exploración computacional produce una tasa de acierto aumentada, disminuyendo de este modo el número de variantes que tienen que explorarse de manera experimental. Un obstáculo adicional al diseño por ingeniería genética de Fc es la necesidad del diseño activo de mutaciones correlacionadas o acopladas. Por ejemplo, la máxima potenciación de la afinidad de Fc/Fc γ R observada hasta ahora es S298A/E333A/K334A, obtenida combinando tres mejores moléculas de unión obtenidas por separado en un barrido de alanina (Shields *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 6591-6604). La exploración computacional es capaz de generar dicha variante triple en un experimento en lugar de en tres separados, y además es capaz de probar la funcionalidad de los 20 aminoácidos en estas posiciones en lugar de solo alanina. La exploración computacional lidia con dicha complejidad reduciendo el programa combinatorio a un tamaño tratable de manejar experimental.

La exploración computacional, vista ampliamente, tiene cuatro etapas: 1) selección y preparación de la estructura o estructuras molde de la proteína, 2) selección de posiciones variables, de aminoácidos que se van a tener en consideración en esas posiciones, y/o la selección de rotámeros para modelar los aminoácidos considerados, 3) cálculo de la energía y 4) optimización combinatoria. En más detalle, el proceso de exploración computacional puede describirse del modo siguiente. Se usa una estructura tridimensional de una proteína como punto de partida. Se identifican las posiciones que se van a optimizar, que pueden ser la secuencia completa de la proteína o un subconjunto (o subconjuntos) de la misma. Se seleccionan los aminoácidos que se tendrán en consideración en cada posición. En una realización preferida, cada aminoácido tomado en consideración puede presentarse mediante un conjunto discreto de conformaciones permitidas, denominadas rotámeros. Se calculan las energías de interacción entre cada aminoácido tomado en consideración y entre cada aminoácido tomado en consideración y el resto de la proteína, incluyendo el armazón de la proteína y los restos invariables. En una realización preferida, se calculan las energías de interacción entre cada rotámero de cadena lateral de aminoácido tomado en consideración y el otro

rotámero de cadena lateral de aminoácido tomado en consideración y el resto de la proteína, incluyendo el armazón de la proteína y los restos invariables. Entonces se usan uno o más algoritmos de búsqueda combinatoria para identificar la secuencia de mínima energía y/o las secuencias de baja energía.

5 En una realización preferida, el método de exploración computacional usado es sustancialmente similar a la tecnología Protein Design Automation® (PDA®), tal como se describe en los documentos US 6.188.965; US 6.269.312; US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. En otra realización preferida, se usa un método de exploración computacional sustancialmente similar a la tecnología Sequence Prediction Algorithm™ (SPA™), tal como se describe en (Raha *et al.*, 2000, *Protein Sci* 9: 1106-1119), el documento USSN 09/877.695, y el documento USSN 10/071.859. En otra
10 realización preferida, se usan los métodos de exploración computacional descritos en el documento USSN 10/339788, presentado el 3 de marzo del 2003, titulado "ANTIBODY OPTIMIZATION". En algunas realizaciones, se usan combinaciones de diferentes métodos de exploración computacional, incluyendo combinaciones de tecnología PDA® y tecnología SPA™, así como combinaciones de estos métodos combinatorios en combinación con otras herramientas de diseño. De manera similar, estos métodos computacionales pueden usarse de manera simultánea o
15 secuencial, en cualquier orden.

Se usa una estructura de molde como entrada para los cálculos de exploración computacional. Por "estructura de molde" en el presente documento se entiende las coordenadas estructurales de parte o de toda la proteína que se va a optimizar. La estructura de molde puede ser cualquier proteína para la que se conozca o pueda calcularse, estimarse, modelarse, generarse, o determinarse, una estructura tridimensional (es decir, las coordenadas
20 tridimensionales para un conjunto de los átomos de la proteína). Las estructuras tridimensionales de las proteínas pueden determinarse usando métodos que incluyen, pero sin limitación, técnicas cristalográficas de rayos X, técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), modelado desde cero, y modelado por homología. Si se desea optimizar una proteína para la cual aún no se ha resuelto su estructura experimentalmente, puede generarse un modelo estructural adecuado que puede servir como molde para los cálculos de exploración computacional. Se conocen en la técnica métodos para generar modelos de homología de proteínas, y estos métodos son útiles en la presente invención. Véase, por ejemplo, Luo, *et al.* 2002, *Protein Sci* 11: 1218-1226, Lehmann y Wyss, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12(4): 371-5.; Lehmann *et al.*, 2000, *Biochim Biophys Acta* 1543(2): 408-415; Rath y Davidson, 2000, *Protein Sci*, 9(12): 2457-69; Lehmann *et al.*, 2000, *Protein Eng* 13(1): 49-57; Desjarlais y Berg, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6): 2256-60; Desjarlais y Berg, 1992, *Proteins* 12(2): 101-4; Henikoff y Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff y Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243(4): 574-8; Morea *et al.*, 2000, *Methods* 20: 267-269. También pueden obtenerse complejos proteína/proteína usando métodos de acoplamiento. Las estructuras de
25 proteína adecuadas que pueden servir como estructuras de molde incluyen, pero sin limitación, todas de aquellas encontradas en la base de datos de proteína compilada y proporcionada por el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB, anteriormente el Brookhaven National Lab).

35 La estructura de molde puede ser de una proteína de origen natural o está diseñada por ingeniería genética. La estructura de molde puede ser de una proteína que está sustancialmente codificada por una proteína de cualquier organismo, prefiriéndose de ser humano, ratón, rata, conejo y mono. La estructura de molde puede comprender cualquiera de una serie de formas estructurales de proteína. En una realización preferida, la estructura de molde comprende una región Fc o un dominio o fragmento de Fc. En una realización preferida alternativa, la estructura de
40 molde comprende Fc o un dominio o fragmento de Fc unido a uno o más ligandos de Fc, prefiriéndose un complejo Fc/FcγR. El Fc en la estructura de molde puede estar glucosilado o no glucosilado. La estructura de molde puede comprender más de una cadena de proteína. La estructura de molde puede contener además componentes no proteínicos, incluyendo, pero sin limitación, moléculas pequeñas, sustratos, cofactores, metales, moléculas de agua, grupos prostéticos, polímeros y carbohidratos. En una realización preferida, la estructura de molde es una diversidad o conjunto de proteínas de molde, por ejemplo, un conjunto de estructuras tales como aquellas obtenidas mediante
45 RMN. Como alternativa, se genera el conjunto de estructuras de molde a partir de un conjunto de proteínas o estructuras relacionadas, o conjuntos creados de manera artificial. La composición y la fuente de la estructura de molde dependen del objetivo de la modificación por ingeniería genética. Por ejemplo, para potenciar la afinidad de Fc/FcγR humano, puede usarse una estructura compleja de Fc/FcγR humana o un derivado de la misma como estructura de molde. Como alternativa, la estructura de Fc no en complejo puede usarse como estructura de molde. Si el objetivo es potenciar la afinidad de un Fc humano por un FcγR de ratón, la estructura de molde puede ser una estructura o un modelo de un Fc humano unido a un FcγR de ratón.

La estructura de molde puede modificarse o alterarse antes de los cálculos de diseño. Se describen una diversidad de métodos para la preparación de estructuras de molde en los documentos US 6.188.965; US 6.269.312; US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 09/877.695; USSN 10/071.859, USSN 10/218.102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. Por ejemplo, en una realización preferida, pueden añadirse
55 hidrógenos explícitos si no están incluidos en la estructura. En una realización alternativa, se lleva a cabo una minimización de la energía de la estructura para relajar la tensión, incluyendo la tensión debido a las fuerzas de van der Waals, a ángulos de enlace no favorables y a longitudes de enlace no favorables. Como alterativa, la estructura de molde se altera usando otros métodos, tales como manualmente, incluyendo alteraciones dirigidas o al azar. También es posible modificar la estructura de molde durante etapas posteriores de la exploración computacional, incluyendo durante las etapas de cálculo de la energía y de optimización combinatoria. En una realización alternativa, la estructura de molde no se modifica antes o durante los cálculos de exploración computacional.

Una vez que se ha obtenido una estructura de molde, se seleccionan las posiciones variables. Por “posición variable” en el presente documento se entiende una posición en la que se deja que se altere una identidad de aminoácido en un cálculo de exploración computacional. Tal como se conoce en la técnica, permitir que se tengan en consideración modificaciones de aminoácidos solo en determinadas posiciones variables reduce la complejidad de un cálculo y permite que la exploración computacional se diseñe de una manera más directa para el objetivo de diseño. Uno o más restos pueden ser posiciones variables en los cálculos de exploración computacional. Las posiciones que se seleccionan como posiciones variables pueden ser aquellas que contribuyen o que hipotéticamente contribuyen a la propiedad de la proteína que se va a optimizar, por ejemplo, afinidad de Fc por un FcγR, estabilidad de Fc, solubilidad de Fc, y así sucesivamente. Los restos en las posiciones variables pueden contribuir de manera favorable o de manera desfavorable a una propiedad específica de la proteína. Por ejemplo, un resto en una interfaz FcγR puede estar implicado mediando la unión, y por lo tanto esta posición puede variarse en los cálculos de diseño dirigidos a mejorar la afinidad de Fc/FcγR. Como otro ejemplo, un resto que tiene una cadena lateral hidrófoba expuesta puede ser responsable de provocar una agregación desfavorable, y por lo tanto puede variarse esta posición en los cálculos de diseño dirigidos a mejorar la solubilidad. Las posiciones variables pueden ser aquellas posiciones que están implicadas directamente en las interacciones que son determinantes de una propiedad particular de una proteína. Por ejemplo, puede definirse el sitio de unión a FcγR de Fc para que incluya todos los restos que entran en contacto con ese FcγR particular. Por “contacto” en el presente documento se entiende alguna interacción química entre al menos un átomo de un resto de Fc con al menos un átomo del FcγR unido, incluyendo la interacción química, pero sin limitación, interacciones de van der Waals, interacciones de enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas e interacciones hidrófobas. En una realización alternativa, las posiciones variables pueden incluir aquellas posiciones que están implicadas de manera indirecta en una propiedad de una proteína, es decir, dichas posiciones pueden estar próximas a restos que se sabe que o se supone que contribuyen a una propiedad de Fc. Por ejemplo, puede definirse el sitio de unión a FcγR de un Fc para que incluya todos los restos de Fc dentro de una distancia determinada, por ejemplo 4-10 Å, de cualquier resto Fc que esté en contacto de van der Waals con el FcγR. Por lo tanto, las posiciones variables en este caso pueden seleccionarse no solo como restos que estén en contacto directamente con el FcγR sino también aquellos restos de contacto que estén en contacto con el FcγR y por lo tanto influyen la unión de manera indirecta. Las posiciones específicas seleccionadas dependen de la estrategia de diseño que se esté empleando.

Una o más posiciones en la estructura de molde que no son variables pueden ser flotantes. Por “posición flotante” en el presente documento se entiende una posición en la que la conformación de aminoácidos pero no la identidad del aminoácido se permite que varíe en un cálculo de exploración computacional. En una realización, la posición flotante puede tener la identidad del aminoácido progenitor. Por ejemplo, las posiciones flotantes pueden ser posiciones que se encuentren dentro de una distancia pequeña, por ejemplo 5 Å, de un resto de posición variable. En una realización alternativa, una posición flotante puede tener una identidad de aminoácido no progenitora. Dicha realización puede ser útil en la presente invención, por ejemplo, cuando el objetivo es evaluar el resultado energético o la estructura de una mutación específica.

Las posiciones que no son variables o flotantes son fijas. Por “posición fija” se entiende en el presente documento una posición en la que la identidad del aminoácido y la conformación se mantienen constantes en un cálculo de exploración computacional. Las posiciones que pueden ser fijas incluyen restos que no se sabe que estén o no se supone que estén implicados en la propiedad que se va a optimizar. En este caso, la suposición es que se va a ganar poco o nada variando estas posiciones. Las posiciones que son fijas también pueden incluir posiciones cuyos restos se sabe o se supone que son importantes para mantener un plegamiento, estructura, estabilidad, solubilidad y/o función biológica adecuados. Por ejemplo, las posiciones pueden fijarse para restos que interactúen con un ligando de Fc particular o para restos que codifiquen un sitio de glucosilación para asegurar que la unión al ligando de Fc y la glucosilación adecuada, respectivamente, no se vean afectados. Igualmente, si se está optimizando la estabilidad, puede ser beneficioso fijar posiciones que interactúen directa o indirectamente con un ligando de Fc, por ejemplo, un FcγR, de tal forma que la unión no se vea alterada. Las posiciones fijas pueden también incluir restos estructuralmente importantes, tales como cisteínas que participan en puentes disulfuro, restos críticos para determinar la conformación del armazón, tales como prolina o glicina, restos de enlaces de hidrógeno críticos, y restos que forman interacciones de empaquetamiento favorables.

La siguiente etapa en la exploración computacional es seleccionar un conjunto de identidades de aminoácidos posibles que se tendrán en consideración en cada posición variable particular. Este conjunto de posibles aminoácidos se cita en el presente documento como “aminoácidos tomados en consideración” en una posición variable. “Aminoácidos”, tal como se usa en el presente documento, se refiere al conjunto de los 20 aminoácidos naturales y a cualquier análogo no natural o sintético. En una realización, se tienen en consideración todos los 20 aminoácidos naturales. Como alternativa, se tiene en consideración un subconjunto de aminoácidos, o incluso solo un aminoácido en una posición variable dada. Tal como se apreciará por los expertos en la materia, existe un beneficio computacional al tener en consideración únicamente determinadas identidades de aminoácido en las posiciones variables, ya que reduce la complejidad combinatoria de la búsqueda. Además, el hecho de tomar en consideración solo determinados aminoácidos en las posiciones variables puede usarse para ajustar los cálculos hacia estrategias de diseño específicas. Por ejemplo, para la optimización de la solubilidad de Fc no glucosilado, puede ser beneficioso dejar que solo se tengan en consideración aminoácidos polares en restos de Fc no polares que estén expuestos a disolvente en ausencia de carbohidrato. Los aminoácidos no naturales, incluyendo

aminoácidos sintéticos y análogos de aminoácidos naturales, también pueden considerarse como aminoácidos. Por ejemplo, véase Chin *et al.*, 2003, *Science*, 301 (5635): 964-7; y Chin *et al.*, 2003, *Chem Biol.* 10(6): 511-9.

Puede usarse una gran diversidad de métodos, solos o en combinación, para seleccionar qué aminoácidos se tendrán en consideración en cada posición. Por ejemplo, el conjunto de aminoácidos tomados en consideración en una posición variable dada puede seleccionarse basándose en el grado de exposición al disolvente. Los aminoácidos hidrófobos o no polares residen típicamente en el interior o núcleo de una proteína, que es inaccesible o prácticamente inaccesible al disolvente. Por lo tanto, en posiciones variables del núcleo será beneficioso tener en consideración únicamente o principalmente aminoácidos no polares, tales como alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina. Los aminoácidos hidrófilos o polares residen típicamente en el exterior o la superficie de las proteínas, que tiene un grado significativo de accesibilidad al disolvente. Por lo tanto, en las posiciones variables de la superficie puede ser beneficioso tener en consideración únicamente o principalmente aminoácidos polares tales como alanina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina. Algunas posiciones están parcialmente expuestas y parcialmente enterradas, y no son claramente posiciones del núcleo o de la superficie de la proteína, sirviendo de cierto modo como restos de frontera entre los restos del núcleo y de la superficie. Por lo tanto, en dichas posiciones variables de frontera puede ser beneficioso tener en consideración aminoácidos tanto polares como no polares tales como alanina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano y metionina. La determinación del grado de exposición a disolvente en las posiciones variables puede ser mediante evaluación subjetiva o inspección visual de la estructura de molde por un experto en la técnica de biología estructural de proteínas, o usando una diversidad de algoritmos que se conocen en la técnica. La selección de los tipos de aminoácidos a tener en consideración en las posiciones variables puede estar ayudada o determinada en su totalidad por métodos computacionales, tales como el cálculo del área superficial accesible a disolvente, o usando algoritmos que evalúan la orientación de los vectores C_{α} - C_{β} , en relación a la superficie accesible a disolvente, tal como se indica de manera general en los documentos US 6.188.965; 6.269.312; US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. En una realización, cada posición variable puede clasificarse explícitamente como posición de núcleo, de superficie o de frontera o una clasificación sustancialmente similar a núcleo, superficie o frontera.

En una realización alternativa, la selección del conjunto de aminoácidos permitidos en las posiciones variables puede estar basada en hipótesis. Las hipótesis acerca de qué tipos de aminoácidos deben tenerse en consideración en las posiciones variables pueden proceder de una evaluación subjetiva o una inspección visual de la estructura de molde por un experto en la técnica de biología estructural de proteínas. Por ejemplo, si se sospecha que una interacción de enlace de hidrógeno puede ser favorable en una posición variable, pueden tenerse en consideración restos polares que tengan la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, incluso si la posición está en el núcleo. Igualmente, si se sospecha que una interacción de empaquetamiento hidrófobo puede ser favorable en una posición variable, pueden tenerse en consideración restos no polares que tengan la capacidad de formar interacciones de empaquetamiento favorables, incluso si la posición se encuentra en la superficie. Otros ejemplos de estrategias basadas en hipótesis pueden implicar problemas de flexibilidad del armazón o del plegamiento de la proteína. Tal como se conoce en la técnica, determinados restos, por ejemplo prolina, glicina y cisteína, desempeñan papeles importantes en estructura y estabilidad de la proteína. La glicina permite una mayor flexibilidad del armazón que todos los demás aminoácidos, la prolina restringe al armazón más que cualquier otro aminoácido, y las cisteínas pueden formar enlaces disulfuro. Por lo tanto puede ser beneficioso incluir uno o más de estos tipos de aminoácidos para lograr un objetivo de diseño deseado. Como alternativa, puede ser beneficioso excluir uno o más de estos tipos de aminoácidos de la lista de aminoácidos tomados en consideración.

En una realización alternativa, pueden seleccionarse subconjuntos de aminoácidos para maximizar la cobertura. En este caso, pueden tenerse en consideración en las posiciones variables aminoácidos adicionales con propiedades similares a aquellos en la estructura de molde. Por ejemplo, si el resto en una posición variable en la estructura de molde es un resto hidrófobo grande, pueden tenerse en consideración aminoácidos hidrófobos grandes adicionales en esa posición. Como alternativa, pueden seleccionarse subconjuntos de aminoácidos para maximizar la diversidad. En este caso, pueden tenerse en consideración en las posiciones variables aminoácidos con propiedades disímiles a aquellos en la estructura de molde. Por ejemplo, si el resto en una posición variable en el molde es un resto hidrófobo grande, pueden tenerse en consideración aminoácidos que sean pequeños, polares, etc.

Tal como se conoce en la técnica, algunos métodos de exploración computacional requieren únicamente de la determinación de la identidad de los aminoácidos tomados en consideración durante los cálculos de diseño. Es decir, no se necesita información referente a las conformaciones o posibles conformaciones de las cadenas laterales del aminoácido. Otros métodos preferidos utilizan un conjunto discreto de conformaciones de cadena lateral, denominadas rotámeros, que se tienen en consideración para cada aminoácido. Por lo tanto, puede tenerse en consideración un conjunto de rotámeros en cada posición variable y flotante. Los rotámeros pueden obtenerse a partir de bibliotecas de rotámero publicadas (véase, por ejemplo, Lovel *et al.*, 2000, *Proteins: Structure Function and Genetics* 40: 389-408; Dunbrack y Cohen, 1997, *Protein Science* 6: 1661-1681; DeMaeyer *et al.*, 1997, *Folding and Design* 2: 53-66; Tuffery *et al.*, 1991, *J Biomol Struct Dyn* 8: 1267-1289, Ponder y Richards, 1987, *J Mol Biol* 193: 775-791). Tal como se conoce en la técnica, las bibliotecas de rotámeros pueden ser independientes del armazón o dependientes del armazón. Los rotámeros también pueden obtenerse mediante mecánica molecular o cálculos

iniciales, y usando otros métodos. En una realización preferida, se usa un modelo de rotámero flexible (véase Mendes *et al.*, 1999, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37: 530-543). De manera similar, pueden usarse rotámeros generados de manera artificial o aumentar el conjunto seleccionado para cada aminoácido y/o posición variable. En una realización, se incluye al menos una conformación que no sea baja en energía en la lista de rotámeros. En una realización alternativa, el rotámero del resto de posición variable en la estructura de molde se incluye en la lista de rotámeros permitidos para esa posición variable. En una realización alternativa, solo se proporciona la identidad de cada aminoácido tomado en consideración en las posiciones variables, y no se usan estados conformacionales específicos de cada aminoácido durante los cálculos de diseño. Esto es, el uso de rotámeros no es esencial para la exploración computacional.

Puede usarse información experimental para orientar la selección de las posiciones variables y/o la selección de los aminoácidos tomados en consideración en las posiciones variables. Tal como se conoce en la técnica, a menudo se llevan a cabo experimentos de mutagénesis para determinar el papel de determinados restos en la estructura y función de la proteína, por ejemplo, qué restos de la proteína desempeñan un papel para determinar la estabilidad, o qué restos forman la interfaz de una interacción proteína-proteína. Los datos obtenidos de dichos experimentos son útiles en la presente invención. Por ejemplo, las posiciones variables para potenciar la afinidad Fc/Fc γ R pueden implicar variar todas las posiciones en las que se ha demostrado que la mutación afecte a la unión. De manera similar, pueden usarse los resultados de dicho experimento para orientar la selección de tipos de aminoácidos permitidos en las posiciones variables. Por ejemplo, si se encuentra que determinadas sustituciones de aminoácidos son favorables, pueden tenerse en consideración tipos similares de estos aminoácidos. En una realización, pueden tenerse en consideración aminoácidos adicionales con propiedades similares a aquellas que se hallaron favorables experimentalmente en las posiciones variables. Por ejemplo, si se observó que la mutación experimental de una posición variable en una interfaz Fc/Fc γ R con un resto hidrófobo grande era favorable, el usuario puede elegir incluir aminoácidos hidrófobos grandes adicionales en esa posición en la exploración computacional. Tal como se conoce en la técnica, pueden acoplarse tecnologías de presentación y otras de selección con mutagénesis al azar para generar una lista o listas de sustituciones de aminoácidos que son favorables para la propiedad seleccionada. Dicha lista o listas obtenidas a partir de dicho trabajo experimental son útiles en la presente invención. Por ejemplo, las posiciones que se encuentra que son invariables en dicho experimento pueden excluirse como posiciones variables en los cálculos de exploración computacional, mientras que las posiciones que se encuentra que son más aceptables para la mutación o que responden favorablemente a la mutación pueden seleccionarse como posiciones variables. De manera similar, los resultados de dichos experimentos pueden usarse para orientar la selección de los tipos de aminoácidos permitidos en las posiciones variables. Por ejemplo, si surgen determinados tipos de aminoácidos más frecuentemente en una selección experimental, pueden tenerse en consideración tipos similares a los de estos aminoácidos. En una realización, pueden tenerse en consideración aminoácidos adicionales con propiedades similares a aquellas que se encontraron favorables experimentalmente en las posiciones variables. Por ejemplo, si se observa que las mutaciones seleccionadas en una posición variable que se encuentra en una interfaz Fc/Fc γ R son aminoácidos polares no cargados, el usuario puede elegir incluir aminoácidos polares no cargados adicionales, o quizá aminoácidos polares cargados en esa posición.

También puede usarse información de secuencia para orientar la selección de las posiciones variables y/o la selección de aminoácidos tomados en consideración en las posiciones variables. Tal como se conoce en la técnica, algunas proteínas comparten un armazón estructural común y son homólogas en secuencia. Puede usarse esta información para obtener una visión acerca de las posiciones particulares en la familia de la proteína. Tal como se conoce en la técnica, a menudo se llevan a cabo alineamientos de secuencias para determinar qué restos de proteína están conservados y cuáles no están conservados. Es decir, al comparar y contrastar los alineamientos de secuencias de proteínas, puede observarse el grado de variabilidad en una posición, y pueden observarse los tipos de aminoácidos que aparecen de manera natural en estas posiciones. Los datos obtenidos de dicho análisis son útiles en la presente invención. Los beneficios del uso de información de secuencia para seleccionar posiciones variables y aminoácidos tomados en consideración en las posiciones variables son múltiples. Para la selección de posiciones variables, la principal ventaja de usar informaciones de secuencia es que puede obtenerse una visión de qué posiciones son más tolerantes y cuáles son menos tolerantes a la mutación. Por lo tanto, la información de secuencia puede ayudar a asegurar que la diversidad de calidad, es decir, mutaciones que no son perjudiciales para la estructura, estabilidad, etc. de la proteína se muestre computacionalmente. La misma ventaja se aplica al uso de información de secuencia para seleccionar tipos de aminoácidos tomados en consideración en las posiciones variables. Esto es que el conjunto de aminoácidos que aparecen en un alineamiento de secuencia de proteína pueden entenderse como preseleccionados mediante evolución para que tengan una probabilidad mayor que el azar para ser compatibles con la estructura, estabilidad, solubilidad, función, etc. de una proteína. Por lo tanto, la diversidad de mayor calidad se muestrea de manera computacional. Un segundo beneficio del uso de información de secuencia para seleccionar tipos de aminoácidos tomados en consideración en posiciones variables es que determinados alineamientos pueden representar secuencias que pueden ser menos inmunogénicas que las secuencias al azar. Por ejemplo, si los aminoácidos tomados en consideración en una posición variable dada son el conjunto de aminoácidos que aparecen en esa posición en un alineamiento de secuencias de proteína humana, esos aminoácidos pueden considerarse como preexplorados por la naturaleza para generar una respuesta inmune baja o nula si la proteína optimizada se usa como agente terapéutico para seres humanos.

La fuente de las secuencias puede variar ampliamente, e incluye una o más de las bases de datos conocidas, incluyendo, pero sin limitación, la base de datos de Kabat (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, SwissProt, GenBank y Entrez, y la Base de datos de Secuencias de Nucleótidos del EMBL. La información de secuencia de proteína puede obtenerse, compilarse y/o generarse a partir de alineamientos de secuencias de proteínas de origen natural de cualquier organismo, incluyendo, pero sin limitación, mamíferos. Hay numerosos programas de alineamiento basados en secuencias y métodos conocidos en la técnica, y todos estos son útiles en la presente invención para la generación de alineamientos de secuencias de proteínas que comprenden Fc y ligandos de Fc.

Una vez que se efectúan los alineamientos, puede usarse la información de secuencia para orientar la selección de posiciones variables. Dicha información de secuencia puede estar relacionada con la variabilidad, ya sea natural o de otro modo, de una posición dada. La variabilidad en el presente documento debe distinguirse de la posición variable. La variabilidad se refiere al grado en el que una posición dada en un alineamiento de secuencia muestra variación en los tipos de aminoácidos que aparecen en ella. La posición variable, reiterando, es una posición seleccionada por el usuario para su variación en cuanto a la identidad de aminoácidos durante un cálculo de exploración computacional. La variabilidad puede determinarse de manera cualitativa por un experto en la técnica de la bioinformática. También se conocen métodos en la técnica para determinar cuantitativamente la variabilidad que pueden ser útiles en la presente invención. La realización más preferida mide la Entropía de Información o Entropía de Shannon. Las posiciones variables pueden seleccionarse basándose en la información de secuencia obtenida a partir de secuencias de proteína estrechamente relacionadas, o secuencias que están relacionadas de una manera menos estrecha.

El uso de información de secuencia para seleccionar posiciones variables es de gran uso en la presente invención. Por ejemplo, si una posición de la interfaz de Fc/FcγR en la estructura de molde es triptófano, y se observa que el triptófano en esa posición está en más del 90 % de secuencias en un alineamiento, puede ser beneficioso dejar esa posición fija. Por el contrario, si se encuentra que otra posición de interfaz tiene un mayor nivel de variabilidad, por ejemplo, si se observan cinco aminoácidos diferentes en esa posición con frecuencias de aproximadamente el 20 % cada uno, esa posición puede seleccionarse como una posición variable. En otra realización, la inspección visual de las secuencias de proteína alineadas puede sustituir o ayudar a la inspección visual de una estructura de proteína. La información de secuencia también puede usarse para orientar la selección de aminoácidos tomados en consideración en posiciones variables. Dicha información de secuencia puede estar relacionada con la frecuencia de aparición de un aminoácido, aminoácidos, o tipos de aminoácidos (por ejemplo polares o no polares, cargados o no cargados) de manera natural o de otro modo, en una posición dada. En una realización, el conjunto de aminoácidos tomados en consideración en una posición variable puede comprender el conjunto de aminoácidos que se observa en esa posición en el alineamiento. Por lo tanto, la información de alineamiento específico de posición se usa directamente para generar la lista de aminoácidos tomados en consideración en una posición variable en un cálculo de exploración computacional. Dicha estrategia se conoce bien en la técnica; véase, por ejemplo, Lehmann y Wyss, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12(4): 371-5; Lehmann *et al.*, 2000, *Biochim Biophys Acta* 1543(2): 408-415; Rath y Davidson, 2000, *Protein Sci*, 9(12): 2457-69; Lehmann *et al.*, 2000, *Protein Eng* 13(1): 49-57; Desjarlais y Berg, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(6): 2256-60; Desjarlais y Berg, 1992, *Proteins* 12(2): 101-4; Henikoff y Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff y Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243(4): 574-8. En una realización alternativa, el conjunto de aminoácidos considerados en una posición o posiciones variables puede comprender un conjunto de aminoácidos que se observa con más frecuencia en el alineamiento. Por lo tanto, se aplica un criterio determinado para determinar si la frecuencia de un aminoácido o de un tipo de aminoácido garantiza su inclusión en el conjunto de aminoácidos que se toman en consideración en una posición variable. Tal como se conoce en la técnica, los alineamientos de secuencia pueden analizarse usando métodos estadísticos para calcular la diversidad de secuencia en cualquier posición en el alineamiento y la frecuencia o probabilidad de aparición de cada aminoácido en una posición. Dichos datos pueden usarse entonces para determinar qué tipos de aminoácidos se tendrán en consideración. En la realización más sencilla, estas frecuencias de aparición se calculan contando el número de veces que se observa un aminoácido en una posición de alineamiento y después dividiendo entre el número total de secuencias en el alineamiento. En otras realizaciones, se pondera la contribución de cada secuencia, posición o aminoácido al procedimiento de recuento mediante una diversidad de mecanismos posibles. En una realización preferida, la contribución de cada secuencia alineada a la estadística de frecuencia se pondera de acuerdo con su ponderación de diversidad en relación a otras secuencias en el alineamiento. Una estrategia común para lograr esto es el sistema de ponderación de secuencia recomendado por Henikoff y Henikoff (Henikoff y Henikoff, 2000, *Adv Protein Chem* 54: 73-97; Henikoff y Henikoff, 1994, *J Mol Biol* 243: 574-8). En una realización preferida, la contribución de cada secuencia a las estadísticas depende del alcance de similitud con la secuencia diana, es decir, la estructura de molde usada, de tal forma que las secuencias con mayor similitud con la secuencia diana se ponderan con mayor valor. Los ejemplos de medidas de similitud incluyen, pero sin limitación, identidad de secuencia, puntuación de similitud BLOSUM, puntuación de similitud de matriz PAM, y puntuación BLAST. En una realización alternativa, la contribución de cada secuencia a la estadística depende de sus propiedades físicas o funcionales conocidas. Estas propiedades incluyen, pero sin limitación, la estabilidad térmica y química, la contribución a la actividad y la solubilidad. Por ejemplo, cuando se optimiza Fc no glucosilado respecto de

solubilidad, aquellas secuencias en un alineamiento que se sabe que son más solubles (véase, por ejemplo, Ewert *et al.*, 2003, *J Mol Biol* 325: 531-553), contribuirán en mayor medida a las frecuencias calculadas.

Independientemente de qué criterios se apliquen para seleccionar el conjunto de aminoácidos en un alineamiento de secuencia que se van a tener en consideración en las posiciones variables, el uso de información de secuencia para seleccionar los aminoácidos tomados en consideración es de gran uso en la presente invención. Por ejemplo, para optimizar la solubilidad de Fc reemplazando restos de la superficie no polares expuestos, los aminoácidos tomados en consideración pueden seleccionarse como el conjunto de aminoácidos, o un subconjunto de aquellos aminoácidos que cumplen determinados criterios, que se observan en una posición en un alineamiento de secuencias de proteínas. Como otro ejemplo, pueden añadirse o eliminarse uno o más aminoácidos de manera subjetiva a partir de una lista de aminoácidos procedente de un alineamiento de secuencia para maximizar la cobertura. Por ejemplo, pueden tenerse en consideración aminoácidos adicionales con propiedades similares a aquellos que se encuentran en un alineamiento de secuencia en las posiciones variables. Por ejemplo, si se observa que una posición Fc que se sabe o se supone que se une a FcγR tiene aminoácidos polares no cargados en un alineamiento de secuencia, el usuario puede elegir incluir aminoácidos polares o cargados adicionales en un cálculo de exploración computacional, o quizá aminoácidos polares cargados en esa posición.

En una realización, se combina información de alineamiento de secuencias con cálculo de energía, tal como se discute más adelante. Por ejemplo, las pseudoenergías pueden derivarse a partir de la información de secuencia para generar una función de puntuación. El uso de una función de puntuación basada en secuencia puede ayudar a reducir significativamente la complejidad de un cálculo. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la materia, el uso únicamente de una función de puntuación basada en secuencia puede ser inadecuado debido a que la información de secuencia puede indicar a menudo correlaciones engañosas entre mutaciones que pueden en realidad entrar en conflicto estructural. Por lo tanto, en una realización preferida, se usa un método de cálculo de energía basado en estructura, ya sea solo o en combinación con una función de puntuación basada en secuencia. Esto es, las realizaciones preferidas no solo se basan en la información de alineamiento de secuencia únicamente como etapa de análisis.

El cálculo de energía se refiere al proceso mediante el cual se puntúan las modificaciones de aminoácidos. Las energías de interacción se miden mediante una o más funciones de puntuación. Son útiles una diversidad de funciones de puntuación en la presente invención para calcular las energías. Las funciones de puntuación pueden incluir cualquier número de potenciales, citados en el presente documento como términos de energía de una función de puntuación, incluyendo, pero sin limitación, un potencial de van der Waals, un potencial de enlace de hidrógeno, un potencial de solvatación atómica u otros modelos de solvatación, un potencial de propensión de estructura secundaria, un potencial electrostático, un potencial torsional y un potencial de entropía. Se usa al menos un término de energía para puntuar cada posición variable o flotante, aunque los términos de energía pueden diferir dependiendo de la posición, de los aminoácidos tomados en consideración, y de otras consideraciones. En una realización, se usa una función de puntuación que usa un término de energía. En la realización más preferida, las energías se calculan usando una función de puntuación que contiene más de un término de energía, por ejemplo describiendo interacciones de van der Waals, solvatación, electrostáticas y de enlace de hidrógeno, y combinaciones de las mismas. En realizaciones adicionales, los términos de energía adicionales incluyen, pero sin limitación, términos entrópicos, energías torsionales, y energías basadas en el conocimiento.

Se describen una diversidad de funciones de puntuación en los documentos US 6.188.965; US 6.269.312; US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 09/877.695; USSN 10/071.859. USSN 10/218.102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. Como apreciarán los expertos en la materia, las funciones de puntuación no necesitan estar limitadas a términos de energía físico-químicos. Por ejemplo, los potenciales basados en el conocimiento pueden ser útiles en la metodología de exploración computacional de la presente invención. Dichos potenciales basados en el conocimiento pueden proceder de secuencias de proteínas y/o estadísticas de estructura, incluyendo, pero sin limitación, los potenciales de enrollamiento, energías de referencia, pseudoenergías, energías basadas en homología y sesgos de secuencia procedentes de alineamientos de secuencia. En una realización preferida, se modifica una función de puntuación para que incluya modelos de inmunogenicidad, tales como funciones procedentes de datos acerca de la unión de péptidos al CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), que pueden usarse para identificar secuencias potencialmente inmunogénicas (véanse, por ejemplo, los documentos USSN 09/903.378; USSN 10/039.170; USSN 60/222.697; USSN 10/339788; PCT WO 01/21823; y PCT WO 02/00165). En una realización, puede usarse información de alineamiento de secuencia para puntuar las sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, la comparación de secuencias de proteínas, independientemente de si la fuente de dicha proteína es de ser humano, mono, ratón u otros, puede usarse para sugerir o puntuar mutaciones de aminoácidos en la metodología de exploración computacional de la presente divulgación. En una realización, tal como se conoce en la técnica, pueden optimizarse o "entrenarse" una o más funciones de puntuación durante el análisis computacional, y después se vuelve a ejecutar el análisis usando el sistema optimizado. Dichas funciones de puntuación alteradas pueden obtenerse, por ejemplo, entrenando una función de puntuación usando datos experimentales. Como apreciarán los expertos en la materia, una serie de campos de fuerza, que están compuestos de uno o más términos de energía, pueden servir como funciones de puntuación. Los campos de fuerza incluyen, pero sin limitación, campos de fuerza iniciales o mecánico cuánticos, campos de fuerza semiempíricos, y campos de fuerza de mecánica molecular. Las funciones de puntuación que están basadas en el conocimiento o que usan métodos estadísticos pueden ser útiles en la presente invención.

Estos métodos pueden usarse para evaluar la coincidencia entre una secuencia y una estructura de proteína tridimensional, y por lo tanto pueden usarse para puntuar sustituciones de aminoácidos respecto de la fidelidad con la estructura de la proteína. En una realización, pueden usarse cálculos de dinámica molecular para explorar computacionalmente secuencias calculando individualmente las puntuaciones de secuencias mutantes.

- 5 Hay una diversidad de modos para representar aminoácidos para permitir un cálculo eficaz de la energía. En una realización preferida, los aminoácidos tomados en consideración se representan como rotámeros, tal como se ha descrito anteriormente, y se calcula la energía (o puntuación) de la interacción de cada rotámero posible en cada posición variable y flotante con el otro rotámero variable y flotante, con los restos en posiciones fijas y con la estructura de armazón y cualquier átomo no de proteína. En una realización preferida, se calculan dos conjuntos de energías de interacción para cada rotámero de cadena lateral en cada posición variable y flotante: la energía de interacción entre el rotámero y los átomos fijos (la energía de los “sencillos”), y la energía de interacción entre el rotámero de las posiciones variables y flotantes y todos los demás posibles rotámeros en cada una de las otras posiciones variables y flotantes (la energía de los “dobles”). En una realización alternativa, se calculan las energías de los sencillos y de los dobles para las posiciones fijas así como para las posiciones variables y flotantes. En una realización alternativa, los aminoácidos tomados en consideración no se representan como rotámeros.

Un componente importante de la exploración computacional es la identificación de una o más secuencias que tienen una puntuación favorable, es decir, tienen baja energía. La determinación de un conjunto de secuencias de baja energía a partir de un número extremadamente grande de posibilidades no es algo trivial, y para resolver este problema se emplea un algoritmo de optimización combinatoria. La necesidad de un algoritmo de optimización combinatoria se ilustra examinando el número de posibilidades que se toman en consideración en un cálculo de exploración computacional típico. La naturaleza discreta de los conjuntos de rotámeros permite un cálculo simple del número de posibles secuencias rotaméricas para un problema de diseño dado. Un armazón de longitud n con m posibles rotámeros por posición tendrá m^n posibles secuencias de rotámero, un número que crece exponencialmente con la longitud de la secuencia. Para cálculos muy simples, es posible examinar cada posible secuencia para identificar la secuencia óptima y/o una o más secuencias favorables. Sin embargo, para un problema de diseño típico, el número de secuencias posible es suficientemente grande (de hasta 10^{80} o más) de tal forma que el examen de cada secuencia posible es inabordable. Por tanto, puede usarse una diversidad de algoritmos de optimización combinatoria para identificar la secuencia óptima y/o una o más secuencias favorables. Los algoritmos de optimización combinatoria pueden dividirse en dos clases: (1) aquellos que garantizan devolver la configuración de energía mínima global si convergen, y (2) aquellos que no garantizan devolver la configuración de energía mínima global, pero que siempre devolverán una solución. Los ejemplos de la primera clase de algoritmos incluyen, pero sin limitación, *Dead-End Elimination* (DEE) y *Branch & Bound* (B&B) (incluyendo Branch y Terminate) (Gordon y Mayo, 1999, *Structure Fold Des* 7: 1089-98). Los ejemplos de la segunda clase de algoritmos incluyen, pero sin limitación, Monte Carlo (MC), campo medio autoconsistente (SCMF), muestreo de Boltzmann (Metropolis *et al.*, 1953, *J Chem Phys* 21: 1087), hibridación simulada (Kirkpatrick *et al.*, 1983, *Science*, 220: 671-680), algoritmo genético (GA), y Refinado de Topología y Energía de Cadena Lateral Rápida y Precisa (FASTER) (Desmet, *et al.*, 2002, *Proteins*, 48: 31-43). Puede usarse un algoritmo de optimización combinatoria solo o conjuntamente con otro algoritmo de optimización combinatoria.

En una realización de la presente divulgación, la estrategia para aplicar un algoritmo de optimización combinatoria es encontrar la configuración de energía mínima global. En una realización alternativa, la estrategia es encontrar una o más secuencias favorables o de baja energía. En una realización alternativa, la estrategia es encontrar la configuración de energía mínima global y después encontrar una o más secuencias de baja energía favorables. Por ejemplo, tal como se indica en el documento USSN 6.269.312, las realizaciones preferidas utilizan una etapa de *Dead-End Elimination* (DEE) y una etapa de Monte Carlo. En otras realizaciones, se usan algoritmos de búsqueda tabú o se combinan con DEE y/o Monte Carlo, entre otros métodos de búsqueda (véase *Modern Heuristic Search Methods*, editado por V. J. Rayward-Smith *et al.*, 1996, John Wiley & Sons Ltd.; documentos USSN 10/218.102; y PCT WO 02/25588). En otra realización preferida, puede usarse un algoritmo genético; véanse, por ejemplo, los documentos USSN 09/877.695 y USSN 10/071.859. Como otro ejemplo, tal como se describe más ampliamente en los documentos US 6.188.965; US 6.269.312; US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25568, puede lograrse un óptimo global, y después puede producirse un procesamiento computacional adicional, que genera secuencias optimizadas adicionales. En la realización más sencilla, los cálculos de diseño no son combinatorios. Esto es, los cálculos de energía se usan para evaluar sustituciones de aminoácidos individualmente en posiciones variables individuales. Para otros cálculos se prefiere evaluar sustituciones de aminoácidos en más de una posición variable. En una realización preferida, se calculan todas las energías de interacción posibles antes de la optimización combinatoria. En una realización preferida alternativa, pueden calcularse las energías según se necesite durante la optimización combinatoria.

Generación de la biblioteca

La presente divulgación proporciona métodos para generar bibliotecas que pueden posteriormente explorarse experimentalmente para señalar variantes de Fc optimizadas. Por “biblioteca” tal como se usa en el presente documento se entiende un conjunto de una o más variantes de Fc. Una biblioteca puede referirse al conjunto de variantes en cualquier forma. En una realización, la biblioteca es una lista de secuencias de ácido nucleico o de

aminoácidos, o una lista de sustituciones de ácido nucleico o aminoácidos en posiciones variables. Por ejemplo, los ejemplos usados para ilustrar la presente divulgación más adelante proporcionan bibliotecas en forma de sustituciones de aminoácidos en posiciones variables. En una realización, una biblioteca es una lista de al menos una secuencia que son variantes de Fc optimizadas para una propiedad deseada. Por ejemplo, véase, Fillkov *et al.*, 2002, *Protein Sci* 11: 1452-1461 y Luo *et al.*, 2002, *Protein Sci* 11: 1218-1226. En una realización alternativa, puede definirse una biblioteca como una lista combinatoria, lo que significa que se genera una lista de sustituciones de aminoácidos para cada posición variable, con la implicación de que cada sustitución se combinará con todas las demás sustituciones diseñadas y todas las demás posiciones variables. En este caso, la expansión de la combinación de todas las posibilidades en todas las posiciones variables da como resultado una gran biblioteca definida de manera explícita. Una biblioteca puede referirse a una composición física de polipéptidos que comprenden la región Fc o algún dominio o fragmento de la región Fc. Por lo tanto, una biblioteca puede referirse a una composición física de anticuerpos o fusiones de Fc, ya estén en forma purificada o no purificada. Una biblioteca puede referirse a una composición física de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de la biblioteca. Dichos ácidos nucleicos pueden ser los genes que codifican los miembros de la biblioteca, los genes que codifican los miembros de la biblioteca con cualquier ácido nucleico unido operativamente, o vectores de expresión que codifican los miembros de la biblioteca junto con cualquier otra secuencia reguladora, marcadores de selección, construcciones de fusión y/o otros elementos unidos de manera operativa. Por ejemplo, la biblioteca puede ser un conjunto de vectores de expresión en mamífero que codifican miembros de la biblioteca de Fc, cuyos productos de proteína pueden posteriormente expresarse, purificarse y explorarse de manera experimental. Como otro ejemplo, la biblioteca puede ser una biblioteca de presentación. Dicha biblioteca puede, por ejemplo, comprender un conjunto de vectores de expresión que codifican miembros de la biblioteca unidos de manera operativa a algunos compañeros de fusión que permiten la presentación en fagos, presentación en ribosomas, presentación en levaduras, presentación en la superficie bacteriana, y similares.

La biblioteca puede generarse usando la secuencia o secuencias de salida de la exploración computacional. Tal como se ha discutido anteriormente, las bibliotecas generadas computacionalmente están significativamente enriquecidas en secuencias estables, plegadas de manera adecuada y funcionales en relación a las bibliotecas generadas al azar. Como resultado, la exploración computacional aumenta las probabilidades de identificar proteínas que están optimizadas para el objetivo de diseño. El conjunto de secuencias en una biblioteca es generalmente, pero no siempre, significativamente diferente al de la secuencia progenitora, aunque en algunos casos, la biblioteca contiene preferentemente la secuencia progenitora. Tal como se conoce en la técnica, existe una diversidad de formas mediante las cuales puede derivarse una biblioteca a partir de la salida de cálculos de exploración computacional. Por ejemplo, los métodos de generación de bibliotecas descritos en los documentos US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588 son útiles en la presente invención. En una realización, las secuencias con una puntuación dentro de un intervalo determinado de la secuencia óptima global pueden incluirse en la biblioteca. Por ejemplo, todas las secuencias dentro de las 10 kcal/mol de la secuencia de menor energía pueden usarse como biblioteca. En una realización alternativa, pueden usarse secuencias que tengan puntuaciones dentro de un intervalo determinado de una o más secuencias de mínimo local. En una realización preferida, las secuencias de la biblioteca se obtienen a partir de un conjunto filtrado. Dicha lista o conjunto puede generarse mediante una diversidad de métodos, tal como se conoce en la técnica, por ejemplo usando un algoritmo tal como Monte Carlo, B&B, o SCMF. Por ejemplo, la biblioteca puede comprender las 10^3 o las 10^5 secuencias superiores en el conjunto filtrado. Como alternativa, puede usarse el número total de secuencias definido por la combinación de todas las mutaciones como criterio de corte para la biblioteca. Los valores preferidos para el número total de secuencias combinatorias varían de 10 a 10^{20} , variando los valores preferidos particularmente de 100 a 10^9 . Como alternativa, puede forzarse un valor de corte cuando se alcanza un número predeterminado de mutaciones por posición. En algunas realizaciones, se incluyen en la biblioteca las secuencias que no alcanzan el corte. Esto puede ser deseable en algunas situaciones, por ejemplo para evaluar la estrategia de generación de la biblioteca, para proporcionar controles o comparaciones, o para muestrear espacio de secuencia adicional. Por ejemplo, la secuencia progenitora puede incluirse en la biblioteca, incluso si no cumple el corte.

Los algoritmos de agrupamiento pueden ser útiles para clasificar secuencias derivadas mediante métodos de exploración computacional en grupos representativos. Por ejemplo, los métodos de agrupamiento y su aplicación descritos en los documentos USSN 10/218.102 y PCT WO 02/25588, son útiles en la presente invención. Los grupos representativos pueden definirse, por ejemplo, mediante similitud. Las medidas de similitud incluyen, pero sin limitación, similitud de secuencia y similitud energética. Por lo tanto, las secuencias de salida de la exploración computacional pueden agruparse alrededor de mínimos locales, citadas en el presente documento como conjuntos agrupados de secuencias. Por ejemplo, los conjuntos de secuencias que están próximos en el espacio de secuencia pueden distinguirse de otros conjuntos. En una realización, la cobertura dentro de uno o de un subconjunto de conjuntos agrupados puede maximizarse incluyendo en la biblioteca algunas, la mayoría, o todas las secuencias que forman uno o más conjuntos agrupados de secuencias. Por ejemplo, puede ser ventajoso maximizar la cobertura dentro de uno, dos, o tres conjuntos agrupados de mínima energía incluyendo la mayoría de secuencias dentro de estos conjuntos en la biblioteca. En una realización alternativa, puede muestrearse la diversidad a lo largo de los conjuntos agrupados de secuencias incluyendo dentro de una biblioteca solo un subconjunto de secuencias dentro de cada conjunto agrupado. Por ejemplo, todos o la mayoría de los conjuntos agrupados pueden muestrearse ampliamente incluyendo la secuencia de mínima energía de cada conjunto agrupado en la biblioteca.

La información de secuencia puede usarse para orientar o filtrar los resultados de la exploración computacional para la generación de una biblioteca. Tal como se ha discutido, al comparar y contrastar el alineamiento de secuencias de proteína, puede observarse el grado de variabilidad en una posición y los tipos de aminoácidos que aparecen de manera natural en esa posición. Los datos obtenidos a partir de dichos análisis son útiles en la presente invención.

5 Los beneficios de usar información de secuencias se han discutido, y esos beneficios se aplican de manera igual al uso de información de secuencias para orientar la generación de la biblioteca. El conjunto de aminoácidos que aparecen en un alineamiento de secuencias pueden considerarse como preexplorados mediante evolución para que tengan una mayor probabilidad que el azar de ser compatibles con la estructura, estabilidad, solubilidad, función e inmunogenicidad de una proteína. La diversidad de fuentes de secuencia, así como los métodos para generar
10 alineamientos de secuencias que se han discutido, son útiles en la aplicación de la información de secuencias para orientar la generación de la biblioteca. Igualmente, tal como se ha discutido anteriormente, pueden aplicarse varios criterios para determinar la importancia o ponderación de determinados restos en un alineamiento. Estos métodos también son útiles en la aplicación de información de secuencias para orientar la generación de la biblioteca. El uso de información de secuencias para orientar la generación de la biblioteca a partir de resultados de la exploración
15 computacional es de gran utilidad en la presente invención. En una realización, la información de secuencia se usa para filtrar secuencias a partir de la salida de la exploración computacional. Es decir, se eliminan algunas sustituciones de la salida computacional para generar la biblioteca. Por ejemplo, la salida resultante de un cálculo o cálculos de exploración computacional puede filtrarse de tal forma que la biblioteca incluya únicamente aquellos aminoácidos, un conjunto de aquellos aminoácidos que cumplen determinados criterios, por ejemplo, que se observan en esa posición en un alineamiento de secuencias. En una realización alternativa, la información de secuencia se usa para añadir secuencias a la salida de exploración computacional. Es decir, la información de secuencia se usa para orientar la selección de aminoácidos adicionales que se añaden a la salida computacional para generar la biblioteca. Por ejemplo, puede aumentarse el conjunto de aminoácidos de salida para una posición dada a partir de un cálculo de exploración computacional para incluir uno o más aminoácidos que se observan en
20 esa posición en un alineamiento de secuencias de proteínas. En una realización alternativa, basándose en la información de alineamiento de secuencias, pueden añadirse o restarse uno o más aminoácidos a partir de la salida de secuencia de exploración computacional para maximizar la cobertura o diversidad. Por ejemplo, pueden añadirse a la biblioteca aminoácidos adicionales con propiedades similares a aquellos que se encuentran en el alineamiento de secuencias. Por ejemplo, si se observa que una posición tiene aminoácidos polares no cargados en un
25 alineamiento de secuencias, pueden incluirse aminoácidos polares no cargados adicionales en la biblioteca en esa posición.

Las bibliotecas pueden procesarse adicionalmente para generar bibliotecas posteriores. De este modo, la salida de un cálculo o cálculos de exploración computacional puede considerarse como una biblioteca primaria. Esta biblioteca primaria puede combinarse con otras bibliotecas primarias a partir de otros cálculos u otras bibliotecas, procesarse
35 usando cálculos, información de secuencia u otros análisis posteriores o procesarse experimentalmente para generar una biblioteca posterior, en el presente documento citado como una biblioteca secundaria. Tal como se apreciará a partir de esta descripción, el uso de información de secuencia para orientar o filtrar las bibliotecas, discutido anteriormente, es en sí mismo un método para generar bibliotecas secundarias a partir de bibliotecas primarias. La generación de bibliotecas secundarias proporciona al usuario un mayor control de los parámetros en una biblioteca. Esto permite una exploración experimental más eficiente, y puede permitir una retroalimentación a partir de resultados experimentales para que se interpreten más fácilmente, proporcionando un ciclo de diseño/experimentación más eficiente.

Hay una gran variedad de métodos para generar bibliotecas secundarias a partir de bibliotecas primarias. Por ejemplo, los documentos USSN 10/218.102 y PCT WO 02/25588 describen métodos para la generación de
45 bibliotecas secundarias que son útiles en la presente invención. Típicamente, tiene lugar una etapa de selección en la que se procesa una biblioteca primaria de algún modo. Por ejemplo, en una realización, tiene lugar una etapa de selección en la que se selecciona algún conjunto de secuencias primarias para formar la biblioteca secundaria. En una realización alternativa, una etapa de selección es una etapa computacional, incluyendo de nuevo generalmente una etapa de selección, en la que algún subconjunto de la biblioteca primaria se selecciona y después se somete a un análisis computacional adicional, incluyendo una exploración computacional adicional así como técnicas tales como reordenamiento o recombinación "in silico" (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.830.721; US 5.811.238; US 5.605.793; y US 5.837.458, PCR propensa a errores, por ejemplo usando nucleótidos modificados, técnicas de mutagénesis conocidas incluyendo el uso de multicassetes; y reordenamiento de ADN (Cramer *et al.*, 1998, *Nature* 391: 288-291; Coco *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 354-9; Coco *et al.*, 2002, *Nat Biotechnol*, 20: 1246-50), muestras de ADN heterogéneas (documento US 5.939.250); ITCHY (Ostermeier *et al.*, 1999, *Nat Biotechnol* 17: 1205-1209); StEP (Zhao *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 258-261), GSSM (US 6.171.820 y US 5.965.408); recombinación de homólogos *in vivo*, montaje génico asistido por ligasa, PCR complementaria terminal, profusión (Roberts y Szostak, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12297-12302); presentación en la superficie de levaduras/bacterias (Lu *et al.*, 1995, *Biotechnology* 13: 366-372); Seed y Aruffo, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA* 84(10): 3365-3369; Boder y Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557). En una realización alternativa, tiene lugar una etapa de selección que es una etapa experimental, por ejemplo, cualquiera de las etapas de exploración de la biblioteca a continuación, en la que se selecciona un subconjunto determinado de la biblioteca primaria y después se recombina experimentalmente, por ejemplo, usando uno de los métodos de evolución dirigida discutidos a continuación, para formar una biblioteca secundaria. En una realización preferida, la biblioteca primaria se genera y
60

se procesa tal como se indica generalmente en el documento US 6.403.312.

La generación de bibliotecas secundarias y posteriores es de gran uso en la presente invención. En una realización, pueden combinarse diferentes bibliotecas primarias para generar una biblioteca secundaria o posterior. En otra realización, pueden generarse bibliotecas secundarias muestreando la diversidad de secuencia en posiciones altamente mutables o altamente conservadas. La biblioteca primaria puede analizarse para determinar qué posiciones de aminoácidos en la proteína molde tienen alta frecuencia mutacional, y qué posiciones tienen baja frecuencia mutacional. Por ejemplo, las posiciones en una proteína que muestran una gran cantidad de diversidad mutacional en la exploración computacional pueden fijarse en una ronda posterior de cálculos de diseño. Un conjunto filtrado del mismo tamaño que el primero podría mostrar en este caso la diversidad en las posiciones que estaban conservadas en gran medida en la primera biblioteca. Como alternativa, la biblioteca secundaria puede generarse variando los aminoácidos en las posiciones que tengan alto número de mutaciones, a la vez que se mantienen constantes las posiciones que no tienen mutaciones por encima de una determinada frecuencia.

Esta discusión no pretende restringir la generación de bibliotecas secundarias posteriores a bibliotecas primarias. Tal como se apreciará, las bibliotecas primarias y secundarias pueden procesarse adicionalmente para generar bibliotecas terciarias, bibliotecas cuaternarias y así sucesivamente. De este modo, la generación de bibliotecas es un proceso de iteración. Por ejemplo, pueden construirse bibliotecas terciarias usando una diversidad de etapas adicionales aplicadas a una o más bibliotecas secundarias; por ejemplo, puede tener lugar un análisis computacional adicional, pueden recombinarse las bibliotecas secundarias o pueden combinarse diferentes subconjuntos de bibliotecas secundarias. En una realización preferida, puede generarse una biblioteca terciaria combinando bibliotecas secundarias. Por ejemplo, pueden combinarse las bibliotecas primarias y secundarias que analizan diferentes partes de una proteína para generar una biblioteca terciaria que trata las partes combinadas de la proteína. En una realización alternativa, pueden combinarse las variantes de una biblioteca primaria con las variantes de otra biblioteca primaria para proporcionar una biblioteca terciaria combinada con un menor coste computacional que crea un conjunto filtrado muy grande. Estas combinaciones pueden usarse, por ejemplo, para analizar proteínas grandes, especialmente proteínas multidominio grandes, de las cuales Fc es un ejemplo. Por lo tanto, la descripción anterior de generación de bibliotecas secundarias se aplica a la generación de cualquier biblioteca posterior a la biblioteca primaria, siendo el resultado final una biblioteca final que puede explorarse experimentalmente para obtener variantes de proteína optimizadas para un objetivo de diseño. Estos ejemplos no pretenden restringir la generación de bibliotecas secundarias a cualquier aplicación o teoría de operación particular para la presente divulgación. En su lugar, estos ejemplos pretenden ilustrar que la generación de bibliotecas secundarias, y bibliotecas posteriores, tales como bibliotecas terciarias y así sucesivamente, es ampliamente útil en la metodología de exploración computacional para la generación de bibliotecas.

Producción y exploración experimental

La presente divulgación proporciona métodos para producir y explorar bibliotecas de variantes de Fc. Los métodos descritos no pretenden restringir la presente divulgación a cualquier aplicación o teoría de operación particular. En su lugar, los métodos proporcionados pretenden ilustrar generalmente que pueden producirse una o más variantes de Fc o una o más bibliotecas de variantes de Fc y explorarse experimentalmente para obtener variantes de Fc optimizadas. Las variantes de Fc pueden producirse y explorarse en cualquier contexto, ya sea como una región Fc tal como se ha definido de manera precisa en el presente documento, un dominio o un fragmento de la misma, o un polipéptido mayor que comprende Fc, tal como un anticuerpo o fusión de Fc. Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y exploración 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.

En una realización de la presente divulgación, se usan las secuencias de la biblioteca para crear ácidos nucleicos que codifican las secuencias miembro, y que posteriormente pueden clonarse, expresarse y ensayarse, si se desea, en células hospedadoras. Por lo tanto, puede producirse ácidos nucleicos, y particularmente ADN, que codifica cada secuencia de proteína miembro. Estas prácticas se llevan a cabo usando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, se describe una diversidad de métodos que pueden ser útiles en la presente invención 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). Tal como se apreciará por los expertos en la materia, la generación de secuencias exactas para una biblioteca que comprende un gran número de secuencias es potencialmente cara y laboriosa. Por consiguiente, existe una variedad de técnicas que pueden usarse para generar de manera eficaz bibliotecas de la presente divulgación. Dichos métodos que pueden usarse en la presente invención se describen o citan en los documentos US 6.403.312; USSN 09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, métodos de montaje génico, métodos basados en la PCR y métodos que usan variaciones de la PCR, métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, métodos de oligos agrupados, tales como aquellos usados en el reordenamiento sintético, métodos de amplificación propensa a errores y métodos que usan oligos con mutaciones al azar, métodos de mutagénesis de sitio dirigido clásicos, mutagénesis de casete, y otros métodos de amplificación y síntesis génica. Tal como se conoce en la técnica, existe una gran variedad de kits comercialmente disponibles y métodos para el montaje, mutagénesis, subclonación en vectores y similares de genes, y dichos productos comerciales son útiles en la presente invención para generar ácidos nucleicos que codifican miembros variantes de Fc de una biblioteca.

- Las variantes de Fc de la presente invención pueden producirse cultivando una célula hospedadora transformada con ácido nucleico, preferentemente un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las variantes de Fc, en las condiciones adecuadas para inducir o provocar la expresión de la proteína. Las condiciones adecuadas para la expresión variarán dependiendo de la elección del vector de expresión y de la célula hospedadora, y se determinarán fácilmente por un experto en la técnica mediante experimentación rutinaria. Puede usarse una gran variedad de células hospedadoras adecuadas, incluyendo, pero sin limitación, células de mamífero, bacterias, células de insecto y levaduras. Por ejemplo, se describe una variedad de líneas celulares que pueden ser útiles en la presente invención en el catálogo de líneas celulares de la ATCC®, disponible a través de la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo).
- En una realización preferida, las variantes de Fc se expresan en sistemas de expresión de mamífero, incluyendo sistemas en los que las construcciones de expresión se introducen en las células de mamífero usando virus, tales como retrovirus o adenovirus. Puede usarse cualquier célula de mamífero, prefiriéndose particularmente células humanas, de ratón, rata, hámster y primate. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, incluyendo, pero sin limitación, células T Jurkat, células NIH3T3, CHO, COS, y 293. En una realización alternativa preferida, se expresan proteínas de biblioteca en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacteriana se conocen bien en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*. En realizaciones alternativas, las variantes de Fc se producen en células de insecto o en células de levadura. En una realización alternativa, las variantes de Fc se expresan *in vitro* usando sistemas de traducción sin células. Los sistemas de traducción *in vitro* procedentes tanto de células procariontas (por ejemplo, *E. coli*) como eucariotas (por ejemplo germen de trigo, reticulocitos de conejo) están disponibles y pueden seleccionarse basándose en los niveles de expresión y propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, tal como apreciarán los expertos en la materia, se necesita traducción *in vitro* para algunas tecnologías de presentación, por ejemplo, presentación en ribosomas. Además, las variantes de Fc pueden producirse mediante métodos de síntesis química.
- Los ácidos nucleicos que codifican las variantes de Fc de la presente invención pueden incorporarse en un vector de expresión para expresar la proteína. Puede utilizarse una diversidad de vectores de expresión para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores extracomosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en el genoma de un hospedador. Los vectores de expresión se construyen para que sean compatibles con el tipo de célula hospedadora. Por lo tanto, los vectores de expresión que son útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, aquellos que permiten la expresión de proteínas en células de mamífero, bacterias, células de insecto, levaduras, y en sistemas *in vitro*. Tal como se conoce en la técnica, hay disponible una diversidad de vectores de expresión, ya sea comercialmente o de otro modo, que pueden ser útiles en la presente invención para expresar proteínas variantes de Fc.
- Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente a secuencias de control o reguladoras, a marcadores de selección, a cualquier compañero de fusión, y/o a elementos adicionales. Por “unido operativamente” se entiende en el presente documento que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador de la transcripción y traducción unido operativamente al ácido nucleico que codifica la variante de Fc, y son típicamente adecuados para la célula hospedadora usada para expresar la proteína. En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión a ribosomas, secuencias de inicio y parada transcripcional, secuencias de inicio y parada traduccional, y secuencias potenciadoras o activadoras. Tal como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen o marcador de selección para permitir la selección de las células hospedadoras transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección se conocen bien en la técnica y variarán según de la célula hospedadora usada.
- Las variantes de Fc pueden unirse operativamente a un compañero de fusión para permitir el direccionamiento de la proteína expresada, la purificación, la exploración, la presentación y similares. Los compañeros de fusión pueden unirse a la secuencia de la variante de Fc mediante secuencias enlazadoras. La secuencia enlazadora comprenderá generalmente un número pequeño de aminoácidos, típicamente menos de diez, aunque también pueden usarse enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias enlazadoras se seleccionan para que sean flexibles y resistentes a la degradación. Tal como se apreciará por los expertos en la materia, puede usarse como enlazadores cualquiera de una gran variedad de secuencias. Por ejemplo, una secuencia enlazadora común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS. Un compañero de fusión puede ser una secuencia de direccionamiento o de señal que dirige a la proteína variante de Fc y a cualquier compañero de fusión asociado a una localización celular deseada o al medio extracelular. Tal como se conoce en la técnica, determinadas secuencias de señalización pueden dirigir a una proteína para que se secrete al medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Un compañero de unión también puede ser una secuencia que codifica a un péptido o a una proteína que permite la purificación y/o exploración. Dichos compañeros de fusión incluyen, pero sin limitación, etiquetas de polihistidina (etiquetas His) (por ejemplo, etiquetas H₆ y H₁₀ u otras para su uso con sistemas de Cromatografía de Afinidad de Metal (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad de Ni⁺²)), fusiones de GST, fusiones de MBP, etiqueta Strep, la secuencia diana de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BirA, y etiquetas de epítipo que se usan como diana por anticuerpos (por ejemplo, etiquetas c-myc, etiquetas flag y similares). Tal como apreciarán los expertos en la materia, dichas etiquetas pueden usarse para la purificación, para la exploración o ambas. Por ejemplo, puede purificarse una variante de Fc usando una etiqueta His

inmovilizándola a una columna de afinidad de Ni⁺², y después de la purificación, puede usarse la misma etiqueta His para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta con Ni⁺² para llevar a cabo un ELISA u otro ensayo de unión (tal como se describe más adelante). Un compañero de fusión puede permitir el uso de un método de selección para explorar variantes de Fc (véase más adelante). Los compañeros de fusión que permiten una diversidad de métodos de selección se conocen bien en la técnica, y todos estos son útiles en la presente invención. Por ejemplo, al fusionar los miembros de una biblioteca de variante de Fc a la proteína del gen III, puede emplearse presentación en fagos (Kay *et al.*, Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228: 1315-1317). Los compañeros de fusión pueden permitir el marcaje de las variantes de Fc. Como alternativa, un compañero de unión puede unirse a una secuencia específica en el vector de expresión, permitiendo que el compañero de fusión y la variante de Fc asociada se unan covalentemente o no covalentemente al ácido nucleico que las codifica. Por ejemplo, los documentos USSN 09/642.574; USSN 10/080.376; USSN 09/792.630; USSN 10/023.208; USSN 09/792.626; USSN 10/082.671; USSN 09/953.351; USSN 10/097.100; USSN 60/366.658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; y PCT WO 02/07466 describen dicho compañero de fusión y técnica que pueden ser útiles en la presente invención.

Los métodos para introducir ácido nucleico exógeno en las células hospedadoras se conocen bien en la técnica, y variarán dependiendo de la célula hospedadora usada. Las técnicas incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación de fosfato de calcio, tratamiento con cloruro de calcio, y transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, infección viral o de fago, encapsulación del polinucleótido (o los polinucleótidos) en liposomas, y microinyección directa del ADN en el núcleo. En el caso de células de mamíferos, la transfección puede ser transitoria o estable.

En una realización preferida, las proteínas variantes de Fc se purifican o aíslan después de su expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse de una diversidad de modos conocidos por los expertos en la materia. Los métodos de purificación convencionales incluyen técnicas cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, interacción hidrófoba, afinidad, filtración por tamaño o en gel, y fase inversa, llevados a cabo a presión atmosférica o a alta presión usando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación también incluyen técnicas electroforéticas, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatofoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, conjuntamente con la concentración de proteínas, también son útiles. Tal como se conoce bien en la técnica, una diversidad de proteínas naturales se unen a Fc y a anticuerpos, y estas proteínas pueden ser útiles en la presente invención para la purificación de variantes de Fc. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a las regiones Fc. Igualmente, la proteína L bacteriana se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como por supuesto hace el antígeno diana del anticuerpo. La purificación puede permitirse a menudo mediante un compañero de fusión particular. Por ejemplo, las proteínas variantes de Fc pueden purificarse usando resina de glutatión si se emplea una fusión de GST, cromatografía de afinidad de Ni⁺² si se emplea una etiqueta His, o anticuerpo anti flag inmovilizado si se usa una etiqueta flag. Para una orientación general acerca de las técnicas de purificación adecuadas, véase *Protein Purification: Principles and practice*, 3^a Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994. El grado de purificación necesario variará dependiendo de la exploración o del uso de las variantes de Fc. En algunos casos no se necesita purificación. Por ejemplo, en una realización, si las variantes de Fc se secretan, la exploración puede tener lugar directamente en el medio. Tal como se conoce bien en la técnica, algunos métodos de selección no implican purificación de proteínas. Por lo tanto, por ejemplo, si una biblioteca de variantes de Fc se produce en una biblioteca de presentación en fagos, puede no llevarse a cabo la purificación de proteínas.

Las variantes de Fc pueden explorarse usando una diversidad de métodos, incluyendo, pero sin limitación, aquellos que usan ensayos *in vitro*, ensayos *in vivo* y basados en células, y tecnologías de selección. Las tecnologías de exploración automatizadas y de alto rendimiento pueden utilizarse en los procedimientos de exploración. La exploración puede emplear el uso de un compañero o etiqueta de fusión. El uso de compañeros de fusión se ha discutido anteriormente. Por "etiquetado" se entiende en el presente documento que las variantes de Fc de la invención tienen uno o más elementos, isótopos, o compuestos químicos unidos para permitir la detección en una exploración. En general, las etiquetas se encuentran dentro de tres clases: a) etiquetas inmunitarias, que puede ser un epítipo incorporado como compañero de fusión que se reconoce por un anticuerpo, b) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, y c) etiquetas de molécula pequeña, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de etiquetado. Las etiquetas pueden incorporarse en el compuesto en cualquier posición y pueden incorporarse *in vitro* o *in vivo* durante la expresión de la proteína.

En una realización preferida, las propiedades funcionales y/o biofísicas de las variantes de Fc se exploran en un ensayo *in vitro*. Los ensayos *in vitro* pueden permitir un gran intervalo dinámico para explorar propiedades de interés. Las propiedades de las variantes de Fc que pueden explorarse incluyen, pero sin limitación, estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos de Fc, por ejemplo, FcγR. Pueden explorarse múltiples propiedades de manera simultánea o individual. Las proteínas pueden estar purificadas o no purificadas, dependiendo de las necesidades del ensayo. En una realización, la exploración es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo de unión de variantes de Fc a una molécula de proteína o no de proteína que se sabe o se cree que se une a la variante de Fc. En una realización preferida, la exploración es un ensayo de unión para medir la unión a el antígeno diana del anticuerpo o de la fusión de Fc. En una realización alternativa preferida, la exploración es un ensayo de unión de las variantes de Fc a un ligando de Fc, incluyendo, pero sin limitación, a la familia de los FcγR, al receptor FcRn neonatal, a la proteína de

complemento C1q, y a las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos de Fc pueden ser de cualquier organismo, prefiriéndose de seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los ensayos de unión pueden llevarse a cabo usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ensayos basados en FRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia) y BRET (Transferencia de Energía de Resonancia de Bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo Homogéneo de Proximidad de Luminiscencia Amplificada), Ensayo de Proximidad de Centelleo, ELISA (Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas), SPR (Resonancia de Plasmón Superficial, también conocido como BIACORE®), calorimetría de titulación isoterma, calorimetría de barrido diferencial, electroforesis en gel y cromatografía incluyendo filtración en gel. Estos y otros métodos pueden aprovecharse de algún compañero de fusión o etiqueta de la variante de Fc. Los ensayos pueden emplear una diversidad de métodos de detección, incluyendo, pero sin limitación, etiquetas cromogénicas, fluorescentes, luminiscentes o isotópicas.

Las propiedades biofísicas de las proteínas variantes de Fc, por ejemplo, estabilidad y solubilidad, pueden explorarse usando una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de proteína puede determinarse midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y no plegado. Por ejemplo, las proteínas variantes de Fc de la presente invención pueden desplegarse usando un desnaturizador químico, calor o pH y esta transición puede controlarse usando métodos incluyendo, pero sin limitación, espectroscopía de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de RMN, calorimetría y proteólisis. Tal como se apreciará por los expertos en la materia, los parámetros cinéticos de las transiciones de plegamiento y desplegamiento también pueden controlarse usando estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural general de una proteína variante de Fc pueden determinarse cuantitativamente o cualitativamente usando una gran variedad de métodos que se conocen en la técnica. Los métodos que pueden ser útiles en la presente invención para caracterizar las propiedades biofísicas de las proteínas variantes de Fc incluyen electroforesis en gel, cromatografía tal como cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa, espectrometría de masas, espectroscopía de absorbancia ultravioleta, espectroscopía de fluorescencia, espectroscopía de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isoterma, calorimetría de barrido diferencial, ultracentrifugación analítica, dispersión de luz dinámica, proteólisis y reticulación, medición de la turbidez, ensayos de retardo en filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión a colorante fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopía y detección de agregados mediante ELISA u otro ensayo de unión. También puede ser útil el análisis estructural que emplea técnicas cristalográficas de rayos X y espectroscopía de RMN. En una realización, pueden medirse la estabilidad y/o la solubilidad determinando la cantidad de solución de proteína después de un periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede estar o no expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo, temperatura elevada, bajo pH o la presencia de desnaturizante. Debido a que la función necesita típicamente una proteína estable, soluble y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión anteriormente mencionados también proporcionan formas para llevar a cabo dicha medición. Por ejemplo, puede ensayarse una solución que comprende una variante de Fc respecto de su capacidad para unirse al antígeno diana, después de exponerse a temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos, y después ensayarse de nuevo respecto de la unión al antígeno. Debido a que no se espera que la proteína no plegada y agregada sea capaz de unirse al antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medición de la estabilidad y solubilidad de la variante de Fc.

En una realización preferida, se explora la biblioteca usando uno o más ensayos basados en células o *in vivo*. Para dichos ensayos, las proteínas variantes de Fc, purificadas o no purificadas, se añaden típicamente de manera exógena de tal forma que las células están expuestas a variantes individuales o agrupaciones de variantes que pertenecen a una biblioteca. Estos ensayos están basados típicamente, pero no siempre, en la función de un anticuerpo o fusión de Fc que comprende la variante de Fc; esto es, la capacidad del anticuerpo o fusión de Fc para unirse a un antígeno diana y mediar algún suceso bioquímico, por ejemplo, función efectora, inhibición de la unión a ligando/receptor, apoptosis y similares. Dichos ensayos a menudo implican controlar la respuesta de las células al anticuerpo o fusión de Fc, por ejemplo la supervivencia celular, muerte celular, cambio en la morfología celular o activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o de un gen indicador. Por ejemplo, dichos ensayos pueden medir la capacidad de las variantes de Fc para provocar ADCC, ADCP o CDC. Para algunos ensayos, puede ser necesario añadir células o componentes adicionales, aparte de las células diana, por ejemplo complemento de suero, o células efectoras tales como monocitos de sangre periférica (CMSP), células NK, macrófagos, y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, preferentemente seres humanos, ratones, ratas, conejos y monos. Los anticuerpos y fusiones de Fc pueden provocar la apoptosis de determinadas líneas celulares que expresan el antígeno diana del anticuerpo o pueden mediar el ataque a células diana por células inmunitarias que se han añadido al ensayo. Los métodos para controlar la muerte o la viabilidad celular se conocen en la técnica, e incluyen el uso de colorantes, reactivos inmunoquímicos, citoquímicos y radioactivos. Por ejemplo, los ensayos de tinción de caspasa pueden permitir medir la apoptosis, y la captación o liberación de sustratos radioactivos o colorantes fluorescentes tales como alamar blue pueden permitir controlar el crecimiento o activación celular. En una realización preferida, se usa el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA). Como alternativa, las células diana muertas o dañadas pueden controlarse midiendo la liberación de una o más proteínas intracelulares naturales, por ejemplo, lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional puede servir también como método para ensayar la función en ensayos basados en células. En este caso, puede controlarse la respuesta ensayando respecto de genes o proteínas naturales que pueden estar regulados positivamente, por ejemplo, puede medirse la liberación de determinadas interleucinas, o como

alternativa, la lectura puede ser mediante una construcción indicadora. Los ensayos basados en células también pueden implicar la medición de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una variante de Fc. Los tipos celulares para dichos ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y puede emplearse una diversidad de líneas celulares que se conocen en la técnica.

- 5 Como alternativa, se llevan a cabo exploraciones basadas en células usando células que se han transformado o transfectado con ácidos nucleicos que codifican las variantes de Fc. Esto es, no se añaden proteínas variantes de Fc de manera exógena a las células. Por ejemplo, en una realización, la exploración basada en células utiliza presentación en la superficie celular. Puede emplearse un compañero de fusión que permite la presentación de variantes de Fc en la superficie de las células (Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 395-399). Los métodos de presentación en la superficie celular que pueden ser útiles en la presente invención incluyen, pero sin limitación, presentación en bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 29-34; Georgiou *et al.*, 1993, *Trends Biotechnol* 11: 6-10; Lee *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18: 645-648; Jun *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 576-80), levadura (Boder y Wittrup, 2000, *Methods Enzymol* 328: 430-44; Boder y Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557), y células de mamífero (Whitehorn *et al.*, 1995, *Bio/technology* 13: 1215-1219). En una realización alternativa, las proteínas variantes de Fc no se presentan en la superficie de células, sino que se exploran intracelularmente o en algún otro compartimento celular. Por ejemplo, exploración de expresión periplásmica y citométrica (Chen *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 537-542), el ensayo de complementación de fragmento de proteína (Johnsson y Varshavsky, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10340-10344.; Pelletier *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12141-12146), y la exploración de dos híbridos de levadura (Fields y Song, 1989, *Nature* 340: 245-246) pueden ser útiles en la presente invención. Como alternativa, si un polipéptido que comprende las variantes de Fc, por ejemplo un anticuerpo o fusión de Fc, proporciona alguna ventaja de crecimiento seleccionable a una célula, esta propiedad puede usarse para explorar o seleccionar respecto de variantes de Fc.

25 Tal como se conoce en la técnica, un subconjunto de métodos de exploración son aquellos que seleccionan respecto de miembros favorables de una biblioteca. Dichos métodos se citan en el presente documento como "métodos de selección", y estos métodos son útiles en la presente invención para explorar bibliotecas de variantes de Fc. Cuando las bibliotecas se exploran usando un método de selección, solo aquellos miembros de una biblioteca que son favorables, esto es que cumplen algunos criterios de selección, se propagan, aíslan y/u observan. Tal como se apreciará, debido a que solo se observan las variantes más adecuadas, dichos métodos permiten la exploración de bibliotecas que son mayores que aquellas que son explorables mediante métodos que ensayan la adecuación de los miembros de la biblioteca de manera individual. La selección se permite mediante cualquier método, técnica, o compañero de fusión que una, de manera covalente o no covalente, el fenotipo de una variante de Fc con su genotipo, estos es la función de una variante de Fc con el ácido nucleico que lo codifica. Por ejemplo, el uso de presentación en fago como método de selección está permitido por la fusión de miembros de la biblioteca a la proteína de gen III. De este modo, la selección o aislamiento de proteínas variantes que cumplen algunos criterios, por ejemplo, afinidad de unión para un FcγR, también selecciona respecto de o aísla el ácido nucleico que lo codifica. Una vez aislado, pueden amplificarse el gen o genes que codifican las variantes de Fc. Este proceso de aislamiento y amplificación, citado como paneo, puede repetirse permitiendo un enriquecimiento respecto de variantes de Fc favorables en la biblioteca. En última instancia, la secuenciación de ácido nucleico del ácido nucleico unido permite la identificación del gen.

40 Se conocen en la técnica una diversidad de métodos de selección que pueden ser útiles en la presente invención para explorar bibliotecas variantes de Fc. Estos incluyen, pero sin limitación, presentación en fagos (Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual, Kay *et al.*, 1996, Academic Press, San Diego, CA, 1996; Lowman *et al.*, 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10838; Smith, 1985, *Science* 228: 1315-1317) y sus derivados tales como infección de fago selectiva (Malmberg *et al.*, 1997, *J Mol Biol* 273: 544-551), fago infectivo de manera selectiva (Krebber *et al.*, 1997, *J Mol Biol* 268: 619-630), y paneo de infectividad retardada (Benhar *et al.*, 2000, *J Mol Biol* 301: 893-904), presentación en la superficie celular (Wittrup, 2001, *Curr Opin Biotechnol*, 12: 395-399) tal como presentación en bacterias (Georgiou *et al.*, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 29-34; Georgiou *et al.*, 1993, *Trends Biotechnol* 11: 6-10; Lee *et al.*, 2000, *Nat Biotechnol* 18: 645-648; Jun *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 576-80), levadura (Boder y Wittrup, 2000, *Methods Enzymol* 328: 430-44; Boder y Wittrup, 1997, *Nat Biotechnol* 15: 553-557), y en células de mamífero (Whitehorn *et al.*, 1995, *Bio/technology* 13: 1215-1219), así como en tecnologías de presentación *in vitro* (Amstutz *et al.*, 2001, *Curr Opin Biotechnol* 12: 400-405) tal como presentación de polisoma (Mattheakis *et al.*, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9022-9026), presentación en ribosomas (Hanes *et al.*, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4937-4942), presentación de ARNm (Roberts y Szostak, 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12297-12302; Nemoto *et al.*, 1997, *FEBS Lett* 414: 405-408), y sistema de presentación por inactivación de ribosoma (Zhou *et al.*, 2002, *J Am Chem Soc* 124, 538-543).

Otros métodos de selección que pueden ser útiles en la presente invención incluyen métodos que no se basan en la presentación, tales como métodos *in vivo* que incluyen, pero sin limitación, expresión periplásmica y exploración citométrica (Chen *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 537-542), el ensayo de complementación de fragmento de proteína (Johnsson y Varshavsky, 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10340-10344; Pelletier *et al.*, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12141-12146), y la exploración de dos híbridos de levadura (Fields y Song, 1989, *Nature* 340: 245-246) usados en modo de selección (Visintin *et al.*, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11723-11728). En una realización alternativa, la selección se permite mediante un compañero de fusión que se une a una secuencia específica en el vector de expresión, uniendo de este modo covalentemente o no covalentemente al compañero de fusión y al

miembro de la biblioteca de la variante de Fc asociado con el ácido nucleico que los codifica. Por ejemplo, los documentos USSN 09/642.574; USSN 10/080.376; USSN 09/792.630; USSN 10/023.208; USSN 09/792.626; USSN 10/082.671; USSN 09/953.351; USSN 10/097.100; USSN 60/366.658; PCT WO 00/22906; PCT WO 01/49058; PCT WO 02/04852; PCT WO 02/04853; PCT WO 02/08023; PCT WO 01/28702; y PCT WO 02/07466 describen dicho compañero de fusión y técnica que pueden ser útiles en la presente invención. En una realización alternativa, puede tener lugar selección *in vivo* si la expresión de un polipéptido que comprende la variante de Fc, tal como un anticuerpo o fusión de Fc, confiere alguna ventaja de crecimiento, reproducción o supervivencia a la célula.

Un subconjunto de métodos de selección citados como métodos de "evolución dirigida" son aquellos que incluyen el emparejamiento o cruzamiento de secuencias favorables durante la selección, en algunos casos con la incorporación de nuevas mutaciones. Tal como se apreciará por los expertos en la materia, los métodos de evolución dirigida pueden facilitar la identificación de las secuencias más favorables en una biblioteca, y pueden aumentar la diversidad de secuencias que se exploran. Una diversidad de métodos de evolución dirigida se conocen en la técnica que pueden ser útiles en la presente invención para explorar bibliotecas de variantes de Fc, incluyendo, pero sin limitación, reordenamiento del ADN (documento (PCT WO 00/42561 A3; PCT WO 01/70947 A3), reordenamiento de exones (documento US 6.365.377; Kolkman y Stemmer, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 423-428), reordenamiento de familia (Cramer *et al.*, 1998, *Nature* 391: 288-291; documento US 6.376.246), RACHITT™ (Coco *et al.*, 2001, *Nat Biotechnol* 19: 354- 359; documento PCT WO 02/06469), cebado STEP y al azar de recombinación *in vitro* (Zhao *et al.*, 1998, *Nat Biotechnol* 16: 258-261; Shao *et al.*, 1998, *Nucleic Acids Res* 26: 681-683), ensamblaje génico mediado por exonucleasa (documentos US 6.352.842; US 6.361.974), Gene Site Saturation Mutagenesis™ (documento US 6.358.709), Gene Reassembly™ (documento US 6.358.709), SCRATCHY (Lutz *et al.*, 2001, *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 11248-11253), métodos de fragmentación de ADN (Kikuchi *et al.*, *Gene* 236: 159-167), reordenamiento de ADN monocatenario (Kikuchi *et al.*, 2000, *Gene* 243: 133-137), y tecnología de diseño por ingeniería genética de proteínas mediante evolución dirigida AMEsystem™ (Applied Molecular Evolution) (documentos US 5.824.514; US 5.817.483; US 5.814.476; US 5.763.192; US 5.723.323).

Las propiedades biológicas de los anticuerpos y de las fusiones de Fc que comprenden las variantes de Fc de la presente invención pueden caracterizarse en experimentos en células, tejidos y organismos completos. Tal como se conoce en la técnica, los fármacos se ensayan a menudo en animales, incluyendo, pero sin limitación, ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos para medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento contra una enfermedad o modelo de enfermedad, o para medir la farmacocinética, toxicidad y otras propiedades de un fármaco. Dichos animales pueden citarse como modelos de enfermedad. Los agentes terapéuticos se ensayan a menudo en ratones, incluyendo, pero sin limitación, ratones desnudos, ratones SCID, ratones xenoinjertados, y ratones transgénicos (incluyendo *knockins* y *knockouts*). Por ejemplo, puede ensayarse un anticuerpo o fusión de Fc de la presente invención que esté previsto como un agente terapéutico anticáncer en un modelo de cáncer de ratón, por ejemplo un ratón xenoinjertado. En este método, se injerta o inyecta un tumor o una línea celular tumoral en un ratón, y posteriormente se trata al ratón con el agente terapéutico para determinar la capacidad del anticuerpo o de la fusión de Fc para reducir o inhibir el crecimiento del cáncer. Dicha experimentación puede proporcionar datos significativos para la determinación del potencial de dicho anticuerpo o fusión de Fc para su uso como agente terapéutico. Puede usarse para el ensayo cualquier organismo, preferentemente mamíferos. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados, y por lo tanto pueden usarse para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención. En última instancia se necesitan pruebas de los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención en seres humanos para su aprobación como fármacos, y por consiguiente, se contemplan estos experimentos. Por lo tanto, los anticuerpos y fusiones de Fc de la presente invención pueden ensayarse en seres humanos para determinar su eficacia terapéutica, toxicidad, farmacocinética y/u otras propiedades clínicas.

45 Ejemplos

Se proporcionan ejemplos a continuación para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no pretenden restringir la presente invención a cualquier aplicación o teoría de aplicación concreta.

Para todas las posiciones discutidas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con 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 materia de anticuerpos apreciarán que esta convención consiste en una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, permitiendo una referencia normalizada a posiciones conservadas en las familias de inmunoglobulina. Por consiguiente, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada tal como se define por el índice EU no corresponderán necesariamente a su secuencia secuencial. La Figura 3 muestra los esquemas de numeración secuencial y de índice EU para el anticuerpo alemtuzumab para ilustrar este principio más claramente. También cabe destacar que se han observado polimorfismos en una serie de posiciones de Fc, incluyendo, sin limitación, las posiciones 270, 272, 312, 315, 356 y 358 de Kabat, y por lo tanto pueden existir ligeras diferencias entre la secuencia presentada y las secuencias en la bibliografía científica.

Ejemplo 1. Exploración computacional y diseño de bibliotecas de Fc

Se llevaron a cabo cálculos de exploración computacional para diseñar variaciones de Fc optimizadas. Las variantes de Fc se exploraron, se construyeron y se investigaron computacionalmente de manera experimental a lo largo de varios ciclos de computación/experimentación. Para cada ciclo sucesivo, los datos experimentales proporcionaron una retroalimentación para el conjunto siguiente de cálculos de exploración computacional y diseño de la librería. Todos los cálculos de exploración computacional y de diseño de librerías se presentan en el Ejemplo 1. Para cada conjunto de cálculos, se proporciona una tabla que presenta los resultados y proporciona información y parámetros relevantes.

Varias estructuras diferentes de Fc unido al dominio extracelular de FcγR sirvieron como estructuras de molde para los cálculos de exploración computacional. Las estructuras complejas de Fc/FcγR disponibles públicamente incluyeron el código de referencia de pdb 1E4K (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267-273), y los códigos de referencia de pdb 1IIS y 1IIX (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16469-16477). Las regiones extracelulares de FcγRIIb y FcγRIIIa son idénticas al 96 %, y por lo tanto el uso de la estructura de Fc/FcγRIIb es esencialmente equivalente al uso de FcγRIIIa. Sin embargo, para algunos cálculos, se construyó una estructura de molde de Fc/FcγRIIIa más precisa modelando una mutación D129G en las estructuras de 1IIS y 1E4K (citadas como estructuras de molde de D129G 1IIS y D129G 1E4K). Además, las estructuras para Fc humano unido a los dominios extracelulares de FcγRIIb, F158 FcγRIIIa humano y FcγRIII de ratón se modelaron usando métodos convencionales, la información de secuencia de FcγR disponible, las estructuras de Fc/FcγR anteriormente mencionadas, así como información estructural para complejos no unidos (código de referencia de pdb 1 H9V) (Sondermann *et al.*, 2001. *J Mol Biol* 309: 737-749) (código de referencia de pdb 1FCG) (Maxwell *et al.*, 1999, *Wai Struct Biol* 6: 437-442), FcγRIIb (código de referencia de pdb 2FCB) (Sondermann *et al.*, 1999, *Embo J* 18: 1095-1103), y FcγRIIb (código de referencia de pdb 1E4J) (Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406: 267-273).

Las posiciones variables y los aminoácidos a tener en consideración en esas posiciones se seleccionaron mediante inspección visual de las estructuras de Fc/FcγR y FcγR anteriormente mencionadas, y usando información de accesibilidad al disolvente e información de secuencia. La información de secuencia de los Fc y FcγR fue particularmente útil para determinar posiciones variables en las que las sustituciones pueden proporcionar afinidades distintivas entre receptores activadores e inhibidores. Se exploraron virtualmente todas las posiciones de Cy2 de manera computacional. La estructura de Fc es un homodímero de dos cadenas pesadas (cadenas marcadas A y B en las estructuras de 1IIS, 1IIX, y 1E4K), que incluyen cada uno los dominios bisagra y Cy2-Cy3 (mostrados en la Figura 2). Debido a que el FcγR (cadena marcada C en las estructuras de 1IIS, 1IIX, y 1E4K) se une asimétricamente al homodímero de Fc, a menudo se tuvo en consideración cada cadena por separado en los cálculos de diseño. Para algunos cálculos, los restos de Fc y/o FcγR próximos a restos de posición variable fueron flotantes, esto es que se dejó que variase la conformación del aminoácido pero no la identidad del aminoácido en un cálculo de diseño de proteína para permitir ajustes conformacionales. Estos se indican debajo de cada tabla para cada conjunto de cálculos cuando sea relevante. Los aminoácidos tomados en consideración pertenecían típicamente a las clasificaciones de Núcleo, Núcleo de XM, Superficie, Frontera, Frontera XM, o a Todos los 20, a menos que se indique lo contrario. Estas clasificaciones se definen del modo siguiente: Núcleo: alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, y metionina; Núcleo XM = alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, y triptófano; Superficie = alanina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, lisina e histidina; Frontera = alanina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, triptófano, y metionina; Frontera XM = Frontera = alanina, serina, treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, ácido glutámico, arginina, lisina, histidina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina, y triptófano; Todos los 20 = todos los 20 aminoácidos de origen natural.

La mayoría de los cálculos siguió uno de dos tipos de métodos de exploración computacional generales. En un método, se representaron las conformaciones de los aminoácidos en las posiciones variables como un conjunto de rotámeros de cadena lateral independientes del armazón procedentes de la biblioteca de rotámeros de Dunbrack y Cohen (Dunbrack *et al.*, 1997, *Protein Sci* 6: 1661-1681). Las energías de todas las posibles combinaciones de los aminoácidos tomados en consideración en las posiciones variables seleccionadas se calcularon usando un campo de fuerza que contiene términos que describen interacciones de van der Waals, solvatación, electrostáticas y de enlace de hidrógeno, y la secuencia óptima (estado basal) se determinó usando un algoritmo de *Dead End Elimination* (DEE). Tal como apreciarán los expertos en la materia, la secuencia de mínima energía predicha no es necesariamente la auténtica secuencia de mínima energía debido a errores principalmente en la función de puntuación, junto al hecho de que las diferencias conformacionales sutiles en las proteínas pueden dar como resultado diferencias dramáticas en la estabilidad. Sin embargo, la secuencia de estado basal predicha es probable que sea próxima al auténtico estado basal, y por lo tanto puede explorarse diversidad favorable adicional evaluando la energía de las secuencias que están próximas en espacio de secuencia y energía alrededor del estado basal predicho. Para lograr esto, así como para generar una diversidad de secuencias para una biblioteca, se usó un algoritmo Monte Carlo (MC) para evaluar las energías de 1000 secuencias similares alrededor del estado basal predicho. El número de secuencias de este conjunto de 1000 secuencias que contenían ese aminoácido y esa posición variable se cita como la ocupación para esa sustitución, y este valor puede reflejar cómo es de favorable esa sustitución. Este método de exploración computacional es sustancialmente similar a la tecnología *Protein Design Automation*® (PDA®), tal como se describe en los documentos US 6.188.965; US 6.269.312; US 6.403.312; USSN

09/782.004; USSN 09/927.790; USSN 10/218.102; PCTWO 98/07254; PCT WO 01/40091; y PCT WO 02/25588, y por facilidad para su descripción, se cita como tecnología PDA® a lo largo de los ejemplos. Las tablas que presentan los resultados de estos cálculos proporcionan para cada posición variable en la cadena designada (columna 1) los aminoácidos tomados en consideración en cada posición variable (columna 2), la identidad de aminoácido de Fc de TS en cada posición variable (columna 3), la identidad de aminoácido en cada posición variable en la secuencia de estado basal de DEE (columna 4), y el conjunto de aminoácidos y de ocupación correspondiente que se observan en la salida de Monte Carlo (columna 5).

Otros cálculos utilizaron un algoritmo genético (GA) para explorar secuencias de baja energía, calculándose las energías durante cada ronda de "evolución" para aquellas secuencias que se estaban muestreando. Las conformaciones de aminoácidos en las posiciones variables y flotantes se representaron como un conjunto de rotámeros de cadena lateral procedentes de una biblioteca de rotámeros independientes del armazón usando un modelo de rotámero flexible (Mendes *et al.*, 1999, *Proteins* 37: 530-543). Las energías se calcularon usando un campo de fuerza que contenía términos que describían las interacciones de van der Waals, solvatación, electrostáticas y de enlaces de hidrógeno. Este cálculo generó una lista de 300 secuencias que se predice que sean de baja energía. Para facilitar el análisis de los resultados y la generación de la biblioteca, las 300 secuencias de salida se agruparon computacionalmente en 10 grupos de secuencias similares usando un algoritmo de agrupamiento jerárquico de unión individual del vecino más próximo para asignar secuencias a grupos relacionados basándose en las puntuaciones de similitud (Diamond, 1995, *Acta Cryst D*51: 127-135). Esto es, todas las secuencias dentro de un grupo son muy similares a todas las demás secuencias dentro del mismo grupo y menos similares en secuencias en otros grupos. La secuencia de mínima energía para cada una de estas diez agrupaciones se usa como representativa de cada grupo, y se presentan como resultados. Este método de exploración computacional es sustancialmente similar a la tecnología Sequence Prediction Algorithm™ (SPA™), tal como se describe en (Raha *et al.*, 2000, *Protein Sci* 9: 1106-1119); documentos USSN 09/877.695; y USSN 10/071.859, y por facilidad de descripción, se cita como tecnología SPA™ a lo largo de los ejemplos.

La exploración computacional se aplicó para diseñar interacciones favorables energéticamente en la interfaz Fc/FcγR en grupos de posiciones variables que median o potencialmente median la unión con FcγR. Debido a que la interfaz de unión implica un gran número de restos de Fc en las dos cadenas diferentes, y debido a que los FcγR se unen asimétricamente a Fc, los restos se agruparon en diferentes conjuntos de posiciones variables interactuantes, y se diseñaron en conjuntos separados de cálculos. En muchos casos estos conjuntos se seleccionaron como grupos de restos que se consideraron acoplados, esto es que la energía de uno o más restos depende de la identidad de otros uno o más restos. Se usaron varias estructuras de molde, y en muchos casos los cálculos exploraron sustituciones en ambas cadenas. Para muchos de los conjuntos de posiciones variables, se llevaron a cabo cálculos usando los métodos de exploración computacional de tecnología PDA® y SPA™ descritos. Los resultados de estos cálculos y los parámetros relevantes e información se presentan en las Tablas 1-30 a continuación.

Las tablas que presentan los resultados de estos cálculos proporcionan para cada posición variable en la cadena designada (columna 1) los aminoácidos tomados en consideración en cada posición variable (columna 2), la identidad del aminoácido de Fc de TS en cada posición variable (columna 3) y la identidad de aminoácido en las posiciones variables para la secuencia de mínima energía para cada grupo de agrupación (columnas 4-13). Las tablas 1-59 se separan en dos grupos, tal como se marca a continuación, tecnología PDA® y SPA™. La columna 4 de las tablas de PDA® muestra la frecuencia de cada resto que aparecen en las 1000 principales secuencias durante la ejecución de PDA®. Por lo tanto, en la primera fila de la Tabla 1, en la posición 328, cuando se ejecuta usando aminoácidos de frontera en el conjunto de restos variables para esa posición, L apareció 330 veces en las 1000 secuencia principales, M apareció 302 veces, etc.

Además, se incluyen en las composiciones de la divulgación anticuerpos que tienen cualquiera de los restos de aminoácidos listados en las posiciones listadas, ya sean solos o en cualquier combinación (nótese que las combinaciones preferidas se listan en las reivindicaciones, el sumario y las figuras). Una combinación preferida es los restos de aminoácidos listados en las posiciones listadas en un estado basal (en ocasiones citados en el presente documento como la solución "global" y se distinguen de los de tipo silvestre). De manera similar, las posiciones de restos y los aminoácidos particulares en esas posiciones de restos pueden combinarse entre tablas.

Para las tablas de tecnología SPA™, tales como la Tabla 4, la columna 4 es una ejecución de SPA™ que da como resultado una proteína con los seis aminoácidos listados en las seis posiciones listadas (por ejemplo la columna 4 es una sola proteína con una secuencia de tipo silvestre excepto para 239E, 265G, 267S, 269Y, 270T y 299S. Por lo tanto, cada una de estas proteínas individuales se incluye dentro de la divulgación. Además, también se incluyen combinaciones entre proteínas de SPA™, tanto dentro de las tablas como entre las tablas.

Además, cada tabla muestra la presencia o ausencia de carbohidratos, pero se incluyen específicamente secuencias inversas; por ejemplo, la Tabla 1 se lista para una variante no glucosilada, pero pueden efectuarse estos mismos cambios de aminoácidos en una variante glucosilada.

Además, cada tabla lista la estructura de molde usada, así como los restos "flotantes"; por ejemplo, la Tabla 2 usó una ejecución de PDA® que tenía C120, C132 y C134 flotantes.

Tabla 1

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
328 A	Frontera	L	L	L:330 M:302 E:111 K:62 A:45 Q:39 D:36 S:30 T:28 N:10 R:7
332 A	Superficie	I	R	R:247 K:209 Q:130 H:95 E:92 T:59 D:51 N:51 S:42 A:24
328 B	Frontera	L	L	L:321 M:237 T:166 K:73 R:72 S:55 Q:20 D:17 E:13 A:12 V:10 N:4
332 B	Superficie	I	E	E:269 Q:180 R:145 K:111 D:97 T:78 N:65 S:28 A:14 H:13
Tecnología PDA®, estructura de molde de 1IIS; - carbohidrato				

Tabla 2

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Superficie	S	K	E:349 D:203 K:196 A:95 Q:83 S:63 N:10 R:1
265 A	Frontera XM	D	D	D:616 N:113 L:110 E:104 S:25 A:23 Q:9
299 A	Frontera XM	T	I	1:669 H:196 V:135
327 A	Frontera XM	A	S	A:518 S:389 N:67 D:26
265 B	Frontera XM	D	Q	Q:314 R:247 N:118 I:115 A:63 E:55 D:34 S:22 K:21 V:11
Tecnología PDA®; estructura de molde de 1IIS; + carbohidrato; 120 C, 132 C, 134 C flotantes				

5 **Tabla 3**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Superficie	S	E	E:872 Q:69 D:39 K:16 A:4
265 A	Frontera XM	D	Y	Y:693 H:111 E:69 D:62 F:29 K:19 R:14 W:2 Q:1
267 A	Frontera XM	S	S	S:991 A:9
269 A	Núcleo de XM	E	F	F:938 E:59 Y:3
270 A	Superficie	D	E	E:267 T:218 K:186 D:89 Q:88 R:46 S:34 N:29 H:23 A:20
299A	Frontera XM	T	H	H:486 T:245 K:130 E:40 S:39 D:27 Q:27 A:4 N:2
Tecnología PDA®; estructura de molde de 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 132 C, 133 C. 134 C flotantes				

Tabla 4

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	Superficie	S	E	Q	Q	Q	E	E	E	Q	E	E
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
267 A	All 20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
269 A	Núcleo	E	Y	Y	A	A	V	Y	A	A	A	A
270 A	Superficie	D	T	S	A	S	T	T	T	A	A	A
299 A	All 20	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tecnología SPA™; estructura de molde de 1IIS; + carbohidrato; 120 C, 122 C, 132 C, 133 C, 134 C flotantes

Tabla 5

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
235 A	Frontera XM	L	T	T:195 V:131 L:112 W:107 K:85 F:66 Y:56 E:52 Q:38 S:37 I:34 R:29 H:26 N:23 D:9
296 A	Superficie	Y	N	N:322 D:181 R:172 K:76 Y:70 Q:59 E:48 S:40 H:20 T:11 A:1
298 A	Superficie	S	T	T:370 R:343 K:193 A:55 S:39
235 B	Frontera XM	L	L	L:922 I:78

Tecnología PDA®; estructura de molde de 1IIS; - carbohidrato; 119 C, 128 C, 157 C flotantes

5 **Tabla 6**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
235 A	All 20	L	S	S	P	S	S	S	S	S	S	S
296 A	Superficie	Y	Q	Q	Q	E	E	Q	E	Q	Q	N
298 A	Superficie	S	S	K	K	K	K	S	S	S	K	S
235 B	All 20	L	K	K	K	L	L	L	L	L	L	K

Tecnología SPA™; estructura de molde de 1IIS; + carbohidrato; 119 C, 128 C, 157 C flotantes

Tabla 7

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Superficie	S	E	K:402 E:282 H:116 T:67 R:47 Q:39 D:26 A:11 S:7 N:3
265 B	Frontera XM	D	W	Y:341 W:2831:236 V:77 F:36 H:9 T:7 E:4 K:4 A:2 D:1
327 B	Frontera XM	A	R	R:838 K: 86 H:35 E:12 T:10 Q:7 A:6 D:3 N:3
328 B	Núcleo de XM	L	L	L:1000
329 B	Núcleo de XM	P	P	P:801 A:199
330 B	Núcleo de XM	A	Y	Y:918 F:42 L:22 A:18
332 B	Superficie	I	I	1:792 E:202 Q:5 K:1
PDA® technology; 1IIS template structure; - carbohydrate; floated 88 C, 90 C, 113 C, 114 C, 116 C, 160 C, 161 C				

Tecnología PDA®; estructura de molde de 1IIS; - carbohidrato; 88 C, 90 C, 113 C, 114 C, 116 C, 160 C, 161 C flotantes

5 **Tabla 8**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	Superficie	S	D	T	E	E	E	E	E	E	E	E
265 B	All 20	D	G	G	K	G	K	G	G	K	K	G
327 B	All 20	A	K	M	L	L	N	L	K	L	L	L
328 B	Núcleo	L	M	M	M	L	A	M	L	M	L	L
329 B	Núcleo	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
330 B	Núcleo	A	L	A	A	A	A	A	A	A	A	A
332 B	Superficie	I	I	Q	I	I	Q	Q	E	D	I	I
Tecnología SPA™; estructura de molde de 1IIS; + carbohidrato; 88 C, 90 C, 113 C, 114 C, 116 C, 160 C, 161 C flotantes												

Tabla 9

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	Superficie	S	Q	Q	Q	E	Q	E	Q	E	Q	Q
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 A	All 20	T	S	S	A	S	S	S	S	s	S	S
327 A	All 20	A	A	S	S	S	S	S	S	S	A	S
265 B	All 20	D	N	G	G	G	G	G	G	G	G	G

Tecnología SPA™; estructura de molde de 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 132 C, 134 C flotantes

Tabla 10

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
234 A	Frontera XM	L	K	Y:401 L:260 F:151 I:82 K:63 H:17 Q:11 W:7 R:3 T:2 E:2 V:1
235 A	Frontera XM	L	L	W:777 L:200 K:12 Y:5 I:3 F:2 V:1
234 B	Frontera XM	L	W	W:427 Y:203 L:143 F:74 I:59 E:32 K:23 V:14 D:10 T:7 H:4 R:4
235 B	Frontera XM	L	W	W:380 Y:380 F:135 K:38 L:26 E:15 Q:12 H:8 R:4 T:2

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 113 C, 116 C, 132 C, 155 C, 157 C flotantes

5 **Tabla 11**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
234 A	All 20	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 A	All 20	L	T	L	L	L	L	L	L	L	T	L
234 B	All 20	L	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
235 B	All 20	L	S	A	S	A	A	S	S	S	A	A

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; + carbohidrato; 113 C, 116 C, 132 C, 155 C, 157 C flotantes

Tabla 12

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Frontera XM	S	E	E:235 S:122 D:94 Q:93 A:74 K:70 L:67 T:63 N:57 R:51 I:29 V:18 W:15 H:92
328 A	Frontera XM	L	L	L:688 E:121 K:43 Q:41 A:33 D:26 S:14 T:14 N:12 R:8
332 A	Frontera XM	I	W	I:155 W:95 L:82 K:79 E:74 Q:69 H:67 V:63 R:57 T:57 D:45 S:43 N:42 A:35 F:19 Y:18

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C flotante

Tabla 13

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	L	E	E	Q	E	E	K	K	K	K
328 A	All 20	L	L	Q	L	Q	K	L	L	Q	K	L
332 A	All 20	I	K	K	L	Q	A	K	L	Q	A	Q

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato; 120 C flotante

5 **Tabla 14**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Frontera XM	S	I	R:195 I:169 L:126 V:91 K:89 E:61 H:52 T:50 Q:42 N:35 S:34 D:30 A:26
328 B	Frontera XM	L	L	L:671 T:165 K:40 S:38 E:28 R:17 Q:17 V:11 A:8 D:5
332 B	Frontera XM	I	I	I:387 E:157 L:151 V:78 Q:63 K:50 R:33 T:29 D:25 A:12 N:8 S:6 W:1

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 90 C, 160 C, 161 C flotantes

Tabla 15

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L
328 B	All 20	L	M	R	M	D	T	M	L	Q	D	L
332 B	All 20	I	I	D	Q	Q	Q	L	L	T	Q	L

ES 2 562 177 T3

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato; 90 C, 160 C, 161 C flotantes												

Tabla 16

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Frontera XM	S	T	T:164 S:159 L:156 E:86 W:76 K:71 D:65 A:52 R:43 H:38 Q:38 N:31 I:14 V:7
328 B	Frontera XM	L	L	L:556 E:114 T:84 K:80 S:69 Q:36 A:31 D:15 R:11N:4
332 B	Frontera XM	I	W	I:188 W:177 E:97 L:94 T:59 Q:57 V:54 K:52 F:51 D:34 H:33 S:27 R:26 N:18 A:17 Y:16
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 C flotante				

Tabla 17

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	P	S	P	E	L	L	L	L	L	L
328 B	All 20	L	K	K	K	K	K	L	K	K	K	L
332 B	All 20	I	S	S	E	L	L	L	E	L	L	L
Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; + carbohidrato; 117 C flotante												

5

Tabla 18

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Frontera XM	S	L	K:196 L:171 I:146 E:88 V:76 R:75 T:50 H:45 D:43 Q:39 S:30 N:22 A:19
328 A	Frontera XM	L	W	L:517 F:230 W:164 H:40 K:29 E:11 R:5 T:4
332 A	Frontera XM	I	E	I:283 L:217 E:178 Q:81 V:64 D:47 T:35 K:27 W:18 R:12 A:10 Y:7 N:7 F:6 S:5 H:3
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 87 C, 157 C, 158 C flotantes				

Tabla 19

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	F	Q	E	T	P	P	T	P	P	P
328 A	All 20	L	K	R	R	K	K	M	R	K	M	R
332 A	All 20	I	L	L	I	I	E	I	E	E	I	I

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; + átomos de carbohidrato; 87 C, 157 C, 158 C flotantes

Tabla 20

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
240 A	Núcleo + Thr	V	V	V:698 M:162 T:140
263 A	Núcleo + Thr	V	V	V:966 T:34
266 A	Núcleo + Thr	V	V	V:983 T:17
325 A	Frontera	N	N	N:943 T:40 A:17
328 A	Frontera	L	L	L:610 M:363 K:27
332 A	Glu	I	E	E:1000

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 134 C flotantes

5 **Tabla 21**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	All 20	V	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V
263 A	All 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
266 A	All 20	V	I	V	I	I	T	V	V	V	V	I
325 A	All 20	N	A	N	N	N	Q	T	T	Q	N	T
328 A	All 20	L	K	K	L	K	L	K	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato; 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 134 C flotantes

Tabla 22

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
240 B	Núcleo + Thr	V	V	V:713 T:287
263 B	Núcleo + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	Núcleo + Thr	V	V	V:976 T:24
325 B	Frontera	N	N	N:453 T:296 A:116 D:96 S:30 V:9
328 B	Frontera	L	L	L:623 M:194 T:100 R:72 K:11
332 B	Glu	I	E	E:1000
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1 US; - carbohidrato; 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 161 C flotantes				

Tabla 23

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	All 20	V	A	T	A	T	T	A	A	T	T	T
263 B	All 20	V	V	A	A	T	T	V	V	T	A	T
266 B	All 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V
325 B	All 20	N	N	K	K	N	K	K	N	N	N	N
328 B	All 20	L	R	L	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato; 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 161 C flotantes												

5 **Tabla 24**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
240 B	Núcleo + Thr	V	M	V:715 M:271 T:12 I:2
263 B	Núcleo + Thr	V	V	V:992 T:8
266 B	Núcleo + Thr	V	V	V:996 T:4
325 B	Frontera	N	N	N:651 T:232 D:64 A:53
328 B	Frontera	L	M	M:556 L:407 K:37
332 B	Glu	I	E	E:1000

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 131 C flotantes				

Tabla 25

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 B	All 20	V	T	A	T	A	A	A	A	T	A	A
263 B	All 20	V	T	W	T	T	A	T	T	T	L	L
266 B	All 20	V	L	A	T	T	V	L	T	T	L	V
325 B	All 20	N	A	N	A	A	N	A	A	A	A	A
328 B	All 20	L	L	K	L	L	L	L	L	L	L	L
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; + carbohidrato; 273 B, 275 B, 302 B, 323 B, 131 C flotantes												

Tabla 26

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
240 A	Núcleo + Thr	V	V	V:876 T:109 M:15
263 A	Núcleo + Thr	V	V	V:913 T:87
266 A	Núcleo + Thr	V	V	V:969 T:31
325 A	Frontera	N	V	V:491 N:236 T:187 A:35 D:32 S:19
328 A	Frontera	L	L	L:321 W:290 M:271 F:49 K:46 R:23
332 A	Glu	I	E	E:1000
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 158 C flotantes				

5

Tabla 27

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
240 A	All 20	V	A	T	A	A	T	T	A	A	A	T
263 A	All 20	V	T	T	V	V	T	V	L	L	V	T
266 A	All 20	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
325 A	All 20	N	Q	N	Q	Q	Q	Q	Q	Q	N	N
328 A	All 20	L	K	M	K	K	K	K	K	K	K	K
332 A	Glu	I	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tecnología SPA™; estructura de molde; D129G 1E4K; + carbohidrato; 273 A, 275 A, 302 A, 323 A, 158 C flotantes

5 Los cálculos de exploración computacional estaban dirigidos a diseñar variantes de Fc para optimizar la conformación del carbohidrato de N297 y el dominio Cy2. Al explorar sustituciones energéticamente favorables en las posiciones que interactúan con el carbohidrato, pueden diseñarse por ingeniería genética las variantes que muestrean nuevas conformaciones de carbohidrato potencialmente favorables. Los restos de Fc F241, F243, V262, y V264 median la interacción Fc/carbohidrato y por lo tanto son posiciones diana. Los resultados de estos cálculos de diseño se presentan en la Tabla 28.

Tabla 28

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
241 A	Núcleo	F	Y	Y:172 M:162 L:144 F:140 W:110 I:97 A:91 V:84
243 A	Núcleo	F	Y	Y:211 L:204 W:199 F:160 M:141 A:85
262 A	Núcleo	V	M	M:302 I:253 V:243 A:202
264 A	Núcleo	V	F	I:159 M:152 V:142 L:140 W:136 F:120 Y:104 A:47

Tecnología PDA®; estructura de molde 1IIS; - carbohidrato

10 Los cálculos de exploración computacional estaban dirigidos a diseñar variantes de Fc para optimizar el ángulo entre los dominios Cy3 y Cy2. Los restos P244, P245, P247 y W313, que residen en la interfaz Cy2/Cy3, parecen desempeñar un papel clave en la determinación del ángulo de Cy2-Cy3 y la flexibilidad de los dominios en relación al otro. Al explorar sustituciones energéticamente favorables en estas posiciones, pueden diseñarse variantes que muestrean nuevos ángulos potencialmente favorables y niveles de flexibilidad. Los resultados de estos cálculos de
15 diseño se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
241 A	Núcleo	F	Y	Y:172 M:162 L:144 F:140 W:110 I:97 A:91 V:84
243 A	Núcleo	F	Y	Y:211 L:204 W:199 F:160 M:141 A:85
262 A	Núcleo	V	M	M:302 I:253 V:243 A:202
264 A	Núcleo	V	F	I:159 M:152 V:142 L:140 W:136 F:120 Y:104 A:47

Tecnología PDA®; estructura de molde 1IIS; - carbohidrato

Además de los cálculos anteriores usando métodos de exploración computacional PDA® y SPA™, se usaron cálculos adicionales que usaban únicamente un potencial electrostático para explorar computacionalmente variantes de Fc. Los cálculos con la ley de Coulomb y el escalado de Debye-Huckel resaltaron una serie de posiciones en el Fc para los que las sustituciones de aminoácido podrían afectar favorablemente a la unión a uno o más FcγR, incluyendo posiciones para los que el reemplazo de un aminoácido neutro por un aminoácido cargado negativamente podían potenciar la unión a FcγRIIIa, y para los que el reemplazo de un aminoácido cargado positivamente por un aminoácido cargado negativamente o neutro podrían potenciar la unión a FcγRIIIa. Estos resultados se presentan en la Tabla 30.

Tabla 30

Replacement of a + residue with a - residue	Replacement of a neutral residue with a - residue
H268	S239
K326	Y296
K334	A327
	I332
Escalado de la ley de Coulomb y de Debye-Huckel; estructura de molde 1IIS; + carbohidrato	

Se llevaron a cabo cálculos de exploración computacional para optimizar Fc aglucosilado, esto es para optimizar la estructura, estabilidad, solubilidad y afinidad de Fc por Fc/FcγR en ausencia del carbohidrato de N297. Los cálculos de diseño estaban dirigidos a diseñar sustituciones favorables en el contexto de la estructura de molde de Fc no glucosilada en el resto 297, los restos próximos a este, los restos en la interfaz de Fc/FcγR, y los restos en la interfaz de Fc/carbohidrato. Las posiciones variables se agruparon en diferentes conjuntos de posiciones variables interactuantes y se diseñaron en conjuntos de cálculos separados, y se usaron varias estructuras de molde. Para muchos de los conjuntos de posiciones variables, se llevaron a cabo cálculos usando los métodos de exploración computacional tanto PDA® como SPA™. Los resultados de estos cálculos y la información relevante se presentan en las Tablas 31 - 53 a continuación.

Tabla 31

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
265 A	Frontera XM	D	Y	Y:531 F:226 W:105 H:92 K:21 D:16 E:6 T:3
297 A	Frontera XM	N	D	A:235 S:229 D:166 E:114 N:92 Y:57 F:55 Q:25 H:10 T:7 K:6 L:3 R:1
299 A	Frontera XM	T	L	L:482 Y:186 F:131 T:55 S:51 K:31 H:22 A:18 E:14 Q:10
297 B	Frontera XM	N	I	1:299 K:147 V:85 R:82 W:71 N:65 D:35 E:35 Q:34 S:32 L:31 H:30 T:28 A:26
Tecnología PDA®; estructura de molde 1IIS; - carbohidrato; 122 C, 129 C, 132 C, 155 C flotantes				

Tabla 32

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

ES 2 562 177 T3

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 A	All 20	N	A	T	A	E	K	K	A	A	N	N
299 A	All 20	T	S	K	S	K	F	F	F	F	F	S
297 B	All 20	N	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K

Tecnología SPA™ estructura de molde 1IIS; - carbohidrato; 122 C, 129 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 33

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Superficie	S	E	E:928 Q:65 D:7
265 A	Frontera XM	D	W	W:709 Y:248 F:43
296 A	Superficie	Y	H	H:449 Y:146 E:137 D:89 K:64 N:32 T:30 R:25 Q:23 S:5
297 A	Superficie	N	E	E:471 H:189 D:102 T:97 K:96 R:22 Q:15 S:8
298 A	Frontera XM	S	R	R:353 T:275 K:269 A:56 S:38 E:5 Q:2 H:2
299 A	Frontera XM	T	F	Y:398 F:366 L:217 H:15 K:4

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 34

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	E	Q	Q	E	Q	Q	Q	Q	Q	Q
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	All 20	Y	D	Q	N	N	Q	N	N	N	Q	N
297 A	All 20	N	A	A	N	A	D	D	E	N	N	E
298 A	All 20	S	K	K	K	S	K	K	K	K	S	K
299 A	All 20	T	S	Y	F	S	Y	F	K	F	S	K

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 35

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Superficie	S	E	E:417 T:122 D:117 Q:94 R:84 S:63 K:47 H:29 N:19 A:8
265 B	Frontera XM	D	W	W:865 Y:79 F:55 K:1
296 B	Superficie	Y	Y	Y:549 H:97 D:80 S:75 N:48 E:45 K:32 R:30 Q:28 A:16
297 B	Superficie	N	R	R:265 H:224 E:157 K:154 Q:75 D:47 T:34 N:24 S:13 A:7
298 B	Frontera XM	S	V	V:966 D:10 T:8 A:8 N:4 S:4
299 B	Frontera XM	T	Y	Y:667 F:330 H:3
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; -carbohidrato; 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C flotantes				

Tabla 36

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	S	R	E	K	S	S	E	E	E	K
265 B	All 20	D	A	D	K	Y	A	A	F	F	K	Y
296 B	All 20	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	All 20	N	T	S	T	T	E	E	E	S	E	E
298 B	All 20	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	All 20	T	L	F	E	E	Y	F	Y	F	Y	Y
Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C flotantes												

5

Tabla 37

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Superficie	S	E	E:868 Q:92 D:38 K:1 N:1
265 A	Frontera XM	D	W	W:575 Y:343 F:66 H:15 K:1
296 A	Superficie	Y	H	H:489 Y:103 R:98 K:97 Q:64 D:63 T:41 N:38 E:7
297 A	Asp	N	D	D:1000
298 A	Frontera XM	S	R	R:340 K:262 T:255 A:59 S:57 E:11 Q:10 H:6

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
299 A	Frontera XM	T	F	Y:375 F:323 L:260 H:24 K:18
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C flotantes				

Tabla 38

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	E	Q	E	E	E	E	E	E	Q	E
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
296 A	All 20	Y	E	N	Q	E	N	Q	Q	Q	Q	N
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 A	All 20	S	K	S	K	S	K	K	K	S	K	K
299 A	All 20	T	S	K	Y	S	F	F	F	F	F	K
Tecnología SPA™ estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 128 C, 132 C, 155 C flotantes												

Tabla 39

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Superficie	S	E	E:318 Q:123 T:109 D:108 R:93 S:89 K:69 N:40 H:38 A:13
265 B	Frontera XM	D	W	W:745 Y:158 F:85 K:9 E:1 R:1 H:1
296 B	Superficie	Y	Y	Y:390 H:127 S:83 R:81 K:78 N:65 D:55 E:49 Q:44 A:26 T:2
297 B	Asp	N	D	D:1000
298 B	Frontera XM	S	V	V:890 T:35 A:29 D:19 S:16 N:10 E:1
299 B	Frontera XM	T	Y	Y:627 F:363 H:10
Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 C, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C flotantes				

5

Tabla 40

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	K	E	E	Q	E	K	Q	E	K	Q

ES 2 562 177 T3

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 B	All 20	D	F	K	K	A	K	Y	W	K	L	F
296 B	All 20	Y	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
298 B	All 20	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
299 B	All 20	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	Y

Tecnología SPA™ estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 G, 119 C, 125 C, 129 C, 152 C flotantes

Tabla 41

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Frontera XM	S	E	E:312 L:148 D:102 Q:98 K:64 I:61 S:57 A:44 T:39 N:29 R:23 V:18 W:5
265 A	Frontera XM	D	W	W:363 Y:352 F:139 H:77 K:39 R:14 D:11 E:4 Q:1
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	Frontera XM	T	Y	Y:309 F:224 L:212 H:96 K:92 E:28 Q:20 R:16 T:2 S:1

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 42

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	E	L	L	L	E	E	E	Q	L	E
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	All 20	T	S	K	K	F	F	F	K	F	K	F

Tecnología SPA™ estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

Tabla 43

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Frontera XM	S	L	L:194 T:122 S:120 E:111 D:79 K:71 A:62 Q:57 R:43 H:43 N:37 I:24 W:24 V:13
265 B	Frontera XM	D	W	Y:248 W:233 F:198 K:84 D:57 E:55 H:42 R:28 Q:20 A:10 T:10 N:8 S:7
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	Frontera XM	T	Y	Y:493 F:380 H:76 T:31 E:10 D:4 A:3 S:3

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 C, 119 C, 129 C, 152 C

Tabla 44

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	R	E	P	L	L	F	P	P	L	L
265 B	All 20	D	D	K	S	F	S	Y	A	M	A	D
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	All 20	T	Y	Y	Y	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 117 C, 119 C, 129 C, 152 C flotantes

5 Tabla 45

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 A	Frontera XM	S	E	E:251 L:125 D:120 Q:112 S:73 K:651:61 A:58 T:45 N:35 R:28 V:23 W:4
265 A	Frontera XM	D	Y	Y:216 H:153 K:135 D:109 W:104 F:86 R:54 T:38 E:29 Q:22 A:21 N:17 S:13 L:3
297 A	Asp	N	D	D:1000

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 299 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 46

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 A	All 20	S	S	L	E	L	Q	Q	E	Q	Q	E

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
265 A	All 20	D	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 299 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 47

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
239 B	Frontera XM	S	L	L:158 S:137 T:125 E:115 D:86 K:75 A:62 Q:56 H:43 R:39 N:35 W:30 I:24 V:15
265 B	Frontera XM	D	Y	Y:188 W:159 F:156 D:122 K:77 E:71 H:61 Q:44 R:39 A:24 S:22 N:19 T:18
297 B	Asp	N	D	D:1000

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 299 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C flotantes

Tabla 48

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
239 B	All 20	S	S	E	P	P	E	S	P	L	F	L
265 B	All 20	D	A	K	A	M	K	F	Y	D	F	F
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 299 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C flotantes

5

Tabla 49

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
297 A	Asp	N	D	D:1000
299 A	Frontera XM	T	Y	T:123 Y:64 H:64 K:64 Q:64 F:64 R:63 D:63 E:63 S:63 L:63 N:62 I:57 A:54 V:52 W:17

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 239 A, 265 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C flotantes

Tabla 50

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 A	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 A	All 20	T	K	K	K	K	F	F	K	K	K	K

SPA™ technology; D129G 1IIS template structure; - carbohydrate; floated 239 A, 265 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; - carbohidrato; 239 A, 265 A, 120 C, 122 C, 132 C, 155 C flotantes

5 **Tabla 51**

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
297 B	Asp	N	D	D:1000
299 B	Frontera XM	T	Y	T:123 F:64 Y:64 H:64 S:63 N:61 Q:61 D:61 E:60 K:58 V:57 A:57 R:54 I:52 L:51 W:50

Tecnología PDA®; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 239 B, 265 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C flotantes

Tabla 52

Posición	Aminoácidos considerados	TS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
297 B	Asp	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
299 B	All 20	T	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1E4K; - carbohidrato; 239 B, 265 B, 117 C, 119 C, 129 C, 152 C flotantes

- 10 Se llevaron a cabo cálculos de exploración computacional para optimizar Fc no glucosilado diseñando sustituciones favorables en los restos que están expuestos al disolvente en ausencia de glucosilación de tal forma que sean estables, mantengan la estructura de Fc, y no tengan tendencia a agregarse. El carbohidrato de N297 abarca la parte hidrófoba expuesta que normalmente podría ser la interfaz para una interacción proteína-proteína con otro dominio de Ig, manteniendo la estabilidad e integridad estructural de Fc y evitando que los dominios Cy2 se agreguen a lo largo del eje central. Los restos clave para el diseño son F241, F243, V262, y V264, que residen
- 15 detrás del carbohidrato en Cy2, además de restos tales como L328, I332, e I336, que son restos no polares expuestos que miran hacia el interior del dominio Cy2 opuesto, que se tomaron en consideración en los cálculos presentados anteriormente. La importancia de estos restos de Cy2 está apoyada anotando que los restos correspondientes en el dominio Cy3 mediante alineamiento de secuencia media la interacción no polar entre los dos dominios Cy3 o están enterrados en el núcleo de Cy3. Los resultados de estos cálculos de diseño se presentan en la
- 20 Tabla 53.

Tabla 53

Posición	Aminoácidos considerados	TS	Estado Basal	Secuencias alrededor del Estado Basal
241 A	Superficie	F	E	E:190 R:172 K:138 H:117 T:93 Q:91 D:85 S:49 N:49 A:16
243 A	Superficie	F	R	R:190 H:164 Q:152 E:149 K:92 T:71 D:64 N:58 S:42 A:18
262 A	Superficie	V	D	D:416 E:164 N:138 Q:87 T:83 R:44 S:32 K:24 A:11 H:1
264 A	Superficie	V	H	R:368 H:196 K:147 E:108 Q:68 T:34 N:33 D:25 S:15 A:6
Tecnología PDA®; estructura de molde 1IIS; - carbohidrato				

En un conjunto final de cálculos, se aplicó un método de exploración computacional SPA™ para evaluar el reemplazo de todas las posiciones variables seleccionadas con los todos los 20 aminoácidos. Se determinó la conformación de rotámero de mínima energía para todos los 20 aminoácidos, y esta energía se definió como la energía de sustitución para ese aminoácido en esa posición variable. Estos cálculos proporcionaron por lo tanto una energía de sustitución para cada uno de los 20 aminoácidos en cada posición variable. Estos datos fueron útiles para una diversidad de objetivos de diseño dirigidos tanto a Fc glucosilado como no glucosilado, incluyendo la optimización de la afinidad de Fc/FcγR, la estabilidad de Fc, la solubilidad de Fc, la conformación de carbohidrato, y la conformación de la bisagra. Además, debido a que estos cálculos proporcionan energías para sustituciones tanto favorables como desfavorables, orientan sustituciones que pueden permitir la unión diferencial a FcγR tanto activadores como inhibidores. Se usaron diversas estructuras de molde, y los cálculos exploraron sustituciones en ambas cadenas. Los resultados de estos cálculos y los parámetros e información relevantes se presentan en las Tablas 54-59 a continuación. La columna 1 lista las posiciones variables en la cadena A y B de la estructura de molde 1IIS. La columna 2 lista la identidad de aminoácido de tipo silvestre en cada posición variable. Las demás 20 columnas proporcionan la energía para cada uno de los 20 aminoácidos naturales (mostrados en la fila superior). Todas las sustituciones se normalizaron con respecto a la sustitución de mínima energía, que se ajustó a energía 0. Por ejemplo, en la Tabla 54, para L235 en la cadena A, serina es la sustitución de mínima energía, y L235A es 0,9 kcal/mol menos estable que L235S. Las energías extremadamente altas se ajustaron a 20 kcal/mol para energías entre 20 - 50 kcal/mol, y 50 kcal/mol para energías mayores de 50 kcal/ml. Las sustituciones favorables pueden considerarse como las sustituciones de mínima energía para cada posición, y las sustituciones que tienen una diferencia de energía pequeñas respecto de la sustitución de mínima energía, por ejemplo las sustituciones con 1-2, 1-3, 1-5, o 1-10 kcal/mol.

ES 2 562 177 T3

Tabla 54

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0,9	2,8	2,8	1,5	3,2	3,2	3,4	4,9	1,6	2,1	3,2	0,9	0,3	1,3	0,7	0,0	1,7	4,3	6,5	3,2
236 A	G	0,0	1,9	5,1	6,7	10,0	2,3	4,3	17,2	5,7	20,0	4,6	3,2	12,6	5,6	6,1	0,6	6,2	12,0	6,7	20,0
237 A	G	20,0	20,0	20,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	20,0	50,0	20,0	20,0	50,0	50,0	50,0	20,0	20,0	50,0	50,0	50,0
239 A	S	0,2	4,3	2,6	0,0	12,8	4,5	6,9	11,3	1,7	0,1	2,1	1,7	7,9	1,2	2,6	0,3	5,7	11,0	20,0	20,0
265 A	D	9,0	8,1	6,3	7,8	5,1	0,0	7,3	50,0	8,2	9,9	7,7	6,0	50,0	9,0	8,5	7,8	20,0	50,0	20,0	5,8
267 A	S	2,1	3,3	7,3	1,4	50,0	7,3	20,0	20,0	0,9	2,2	5,0	4,8	0,0	2,2	3,1	2,9	20,0	20,0	50,0	50,0
269 A	E	0,5	2,1	1,3	0,6	1,6	3,9	2,0	1,2	1,1	1,3	2,7	0,0	50,0	0,6	1,1	0,3	0,8	1,0	5,6	1,2
270 A	D	0,3	2,8	2,3	2,0	4,0	4,0	3,4	2,4	1,2	0,0	2,3	2,1	20,0	2,0	2,3	1,4	1,8	4,2	5,4	6,0
296 A	Y	2,7	2,0	1,4	0,0	50,0	0,0	50,0	4,6	2,1	2,4	3,3	1,2	50,0	0,2	1,5	1,3	4,6	4,4	16,3	18,2
298 A	S	0,7	2,4	6,7	3,4	20,0	3,9	20,0	6,7	0,0	4,1	1,4	4,1	50,0	1,8	1,1	0,2	2,2	6,3	17,8	20,0
299 A	T	0,6	2,8	11,5	10,1	20,0	6,1	20,0	10,7	7,1	20,0	4,3	6,8	50,0	6,3	12,0	0,0	3,0	7,1	14,8	20,0
234 B	L	2,1	3,2	4,1	4,2	1,6	5,3	0,1	0,7	0,6	1,0	2,0	1,7	50,0	2,8	0,3	2,3	1,7	2,6	13,0	0,0
235 B	L	0,6	2,3	2,5	0,7	5,4	4,8	1,4	3,6	0,1	0,0	2,0	1,7	16,6	0,5	1,2	0,7	0,7	5,3	6,8	5,5
236 B	G	3,1	1,3	4,4	8,2	5,2	0,0	1,9	20,0	3,1	20,0	4,1	2,7	50,0	3,7	16,0	1,2	20,0	20,0	20,0	11,3
237 B	G	20,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
239 B	S	0,9	2,4	3,4	1,8	5,4	5,6	2,7	3,0	0,9	0,0	2,0	1,6	50,0	1,8	1,8	1,4	1,4	5,1	20,0	5,3
265 B	D	4,5	5,1	4,6	4,6	4,9	0,0	3,8	9,0	2,0	2,5	4,1	2,1	50,0	4,5	5,1	4,4	5,9	9,2	11,4	5,8

ES 2 562 177 T3

Pos	WT	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
327 B	A	1,8	3,4	4,7	3,9	20,0	7,0	20,0	20,0	0,8	0,0	1,9	1,5	20,0	3,0	2,6	3,2	20,0	20,0	20,0	20,0
328 B	L	3,7	3,6	4,0	3,7	50,0	8,4	6,8	50,0	3,8	0,0	2,1	4,1	50,0	3,6	8,1	4,9	3,0	12,5	50,0	50,0
329 B	P	3,4	8,6	20,0	20,0	50,0	8,0	16,8	50,0	20,0	20,0	16,9	20,0	0,0	20,0	20,0	1,3	17,1	16,5	50,0	50,0
330 B	A	0,5	2,0	2,6	0,5	2,4	3,8	1,4	4,2	0,0	2,0	2,2	0,8	20,0	0,1	0,6	0,9	0,3	5,1	8,0	2,7
332 B	I	1,5	2,7	1,2	1,6	11,9	6,8	12,9	1,2	2,9	0,0	1,4	1,7	50,0	1,3	4,9	1,8	1,7	3,0	20,0	20,0

Tecnología SPA™; estructura de molde 1IIS; + átomos de carbohidrato, sin posiciones flotantes

Tabla 55

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
235 A	L	0,9	2,8	2,6	1,7	3,3	3,3	3,4	5,0	1,6	2,1	3,3	1,0	0,3	1,4	1,8	0,0	1,9	3,6	6,6	3,3
236 A	G	0,0	1,7	5,2	6,0	11,3	2,3	4,4	17,2	5,8	19,0	4,9	3,3	8,2	5,6	6,0	0,8	5,6	11,8	6,6	20,0
237 A	G	20,0	20,0	20,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	20,0	50,0	20,0	20,0	50,0	50,0	50,0	20,0	20,0	50,0	50,0	50,0
238 A	P	8,6	8,0	10,5	13,4	6,4	0,0	5,0	50,0	12,4	11,3	9,7	9,3	3,2	12,4	20,0	8,6	50,0	50,0	20,0	8,4
239 A	S	0,1	4,2	2,5	0,0	20,0	4,5	9,0	10,8	1,8	0,2	2,1	1,8	9,1	1,3	2,5	0,3	5,7	10,7	20,0	19,7
240 A	V	1,3	2,4	2,3	6,3	20,0	7,2	20,0	5,1	10,8	6,2	5,7	2,0	1,1	9,5	13,1	2,5	0,5	0,0	20,0	20,0
241 A	F	0,1	1,6	1,2	0,3	0,2	4,1	1,2	10,0	1,3	0,1	2,1	0,4	14,7	0,5	1,1	0,1	0,0	8,3	3,6	0,4
242 A	L	3,0	3,4	5,5	8,3	14,4	8,5	11,1	3,3	13,9	2,2	2,7	5,5	0,9	7,9	17,1	3,8	2,3	0,0	20,0	17,5
243 A	F	1,6	2,2	2,7	0,2	1,4	5,6	2,5	0,0	2,2	2,0	3,0	2,3	10,2	0,5	1,6	1,3	0,9	1,2	5,3	1,6

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
244 A	P	1,2	1,8	3,8	0,8	10, 2	3,8	4,6	20, 0	0,2	2,9	2,0	2,8	2,0	0,9	1,7	0,0	19, 3	20, 0	7,6	12, 2
245 A	P	3,9	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	9,1	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	0,0	20, 0	20, 0	8,0	20, 0	50, 0	20, 0	20, 0
246 A	K	1,3	2,7	2,0	2,0	2,9	5,7	2,9	1,4	1,4	1,5	3,1	0,2	0,0	1,2	1,5	1,7	1,4	1,2	5,4	3,0
247 A	P	1,2	2,1	0,3	0,7	4,0	3,9	3,7	1,8	1,6	1,7	3,3	0,0	0,5	0,9	1,5	0,7	1,1	1,3	6,9	3,7
248 A	K	0,9	2,7	1,5	0,8	3,1	4,7	3,4	3,3	2,0	1,9	2,6	1,2	3,6	1,5	2,3	0,7	0,0	2,5	5,6	2,7
249 A	D	1,2	3,7	1,6	0,0	20, 0	7,3	19, 7	50, 0	1,7	20, 0	2,2	1,4	20, 0	1,5	3,4	2,5	18, 3	50, 0	20, 0	20, 0
250 A	T	0,0	1,8	3,8	5,8	50, 0	6,0	20, 0	4,5	6,3	6,3	0,3	3,2	50, 0	8,7	9,3	1,8	1,3	1,9	20, 0	50, 0
251 A	L	1,1	1,9	1,2	0,5	5,8	5,1	1,9	5,6	0,9	0,7	2,4	1,4	50, 0	0,0	1,4	0,5	0,8	6,9	8,9	5,8
252 A	M	0,3	1,2	0,6	0,0	3,0	3,8	3,4	3,9	1,0	0,3	2,2	0,3	17,4	0,1	1,1	0,1	0,2	4,6	4,2	3,3
253 A	I	0,7	1,7	1,1	0,2	1,8	3,5	2,2	2,0	0,3	1,2	0,8	0,8	0,3	0,0	1,1	0,3	0,5	2,8	2,4	1,9
254 A	S	0,7	1,7	0,4	0,7	2,2	3,6	2,0	0,3	1,2	1,9	2,4	0,0	20, 0	0,3	1,2	0,3	0,8	0,7	3,8	1,9
255 A	R	1,4	2,8	2,4	2,5	0,2	5,4	1,1	17, 0	1,0	2,2	1,5	1,7	50, 0	2,1	0,0	2,3	50, 0	17, 2	4,0	0,5
256 A	T	0,6	1,8	1,2	1,1	2,7	3,4	2,1	1,4	0,7	1,5	2,4	0,0	0,4	0,1	0,2	0,4	0,9	1,2	5,6	2,7
257 A	P	0,0	7,8	20, 0	12, 9	50, 0	6,2	50, 0	20, 0	12, 3	12, 8	14, 4	20, 0	0,1	13, 1	20, 0	2,9	16, 0	20, 0	50, 0	50, 0
258 A	E	0,0	1,6	4,8	2,6	1,0	4,3	2,2	14, 8	4,4	6,2	3,2	2,9	10, 4	7,4	6,0	1,0	6,2	17, 6	20, 0	1,0
259 A	V	3,9	4,3	5,1	8,7	20, 0	10, 3	6,8	2,3	9,6	2,8	6,2	4,1	50, 0	9,2	20, 0	5,2	2,1	0,0	20, 0	20, 0
260 A	T	1,7	2,3	3,3	1,1	20, 0	6,6	8,6	0,0	0,2	1,8	2,8	1,8	1,1	0,8	0,9	1,7	0,4	1,9	7,1	20, 0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
261 A	C	0,0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	3,9	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	50, 0	20, 0	20, 0	3,6	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0
262 A	V	1,9	3,2	0,0	3,3	20, 0	7,2	20, 0	8,3	2,9	2,9	2,2	0,6	50, 0	3,8	5,2	3,4	3,0	1,7	20, 0	20, 0
263 A	V	2,2 ,	2,7	6,0	17, 4	20, 0	8,8	20, 0	10, 0	7,1	7,6	16, 9	5,2	50, 0	19, 8	17, 7	2,8	1,4	0,0	20, 0	20, 0
264 A	V	1,9	3,3	2,8	2,2	0,0	6,4	2,1	0,7	2,6	0,9	2,7	2,1	2,3	2,6	2,7	2,2	1,1	0,6	3,9	0,1
265 A	D	9,0	8,1	5,9	8,6	5,3	0,0	7,3	50, 0	7,9	9,7	7,5	5,5	50, 0	10, 2	8,6	7,9	20, 0	50, 0	20, 0	5,7
266 A	V	4,9	5,3	7,1	12, 1	20, 0	11, 2	20, 0	0,4	12, 2	20, 0	8,8	7,1	50, 0	12, 2	20, 0	6,1	3,8	0,0	20, 0	20, 0
267 A	S	2,3	3,5	7,2	1,3	50, 0	7,4	20, 0	20, 0	0,7	1,4	3,9	4,7	0,0	2,3	3,1	3,0	20, 0	20, 0	50, 0	50, 0
268 A	H	1,2	1,9	2,2	1,5	3,7	5,0	4,9	0,4	0,5	3,7	2,7	1,7	0,0	1,4	1,7	1,1	0,2	0,9	6,1	3,7
269 A	E	0,3	1,9	1,3	0,5	1,3	3,7	1,9	1,1	0,8	1,2	2,5	0,0	50, 0	0,6	0,8	0,2	0,6	0,7	4,0	1,0
270 A	D	0,2	2,6	2,1	1,9	5,2	3,9	3,1	2,1	1,2	0,0	2,2	1,9	20, 0	1,9	1,8	1,2	1,7	4,1	5,1	7,0
271 A	P	0,0	5,3	8,1	9,3	20, 0	3,1	9,1	20, 0	6,0	9,5	5,3	7,3	5,9	5,9	5,9	1,6	4,1	15, 2	20, 0	20, 0
272 A	Q	0,8	1,9	0,9	1,2	3,0	3,2	3,7	3,7	1,6	1,8	3,2	0,3	50, 0	1,1	1,6	0,0	1,0	3,5	4,0	3,4
273 A	V	1,2	2,9	1,8	20, 0	20, 0	7,1	20, 0	6,8	20, 0	20, 0	20, 0	0,0	2,8	20, 0	20, 0	2,1	1,4	1,7	20, 0	20, 0
274 A	K	0,4	1,8	1,4	0,8	1,9	3,9	2,4	1,4	0,7	1,1	2,9	0,9	20, 0	0,0	0,1	0,0	0,4	0,7	3,3	2,3
275 A	F	8,0	9,5	10, 3	9,5	0,0	13, 5	5,1	10, 1	6,2	6,3	6,0	9,1	6,1	9,1	15, 1	9,6	7,2	6,1	13, 5	4,3
276 A	N	1,3	2,4	2,4	2,2	0,8	5,1	0,8	1,2	0,6	2,3	2,5	1,8	50, 0	1,6	2,5	1,2	0,0	0,3	4,2	3,6
277 A	W	5,5	7,4	8,4	6,4	15, 4	11, 2	3,2	8,2	1,9	3,9	3,6	6,6	3,5	5,5	15, 4	6,9	6,1	14, 1	0,0	20, 0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
278 A	Y	1,6	2,7	3,9	1,6	1,0	7,3	3,4	17,7	1,4	7,5	2,1	0,0	50,0	1,9	2,2	2,6	9,9	20,0	15,8	1,4
279 A	V	3,1	4,1	4,0	2,2	20,0	8,1	9,7	8,5	0,0	1,4	3,1	3,3	20,0	1,9	4,6	4,3	3,4	4,2	20,0	20,0
280 A	D	1,8	2,6	2,7	0,2	11,5	2,9	8,8	20,0	3,4	3,2	2,8	3,8	50,0	0,0	3,7	0,6	6,8	12,7	11,9	11,4
281 A	G	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
282 A	V	0,9	2,1	1,6	1,1	2,9	4,2	3,5	1,4	1,5	1,8	3,6	0,4	18,9	0,5	1,0	0,0	0,6	0,9	4,7	3,1
283 A	E	0,7	1,6	0,7	0,5	1,0	4,4	1,4	0,4	1,2	1,8	1,9	0,0	0,4	0,6	1,5	0,4	0,3	1,2	4,1	0,9
284 A	V	0,0	2,2	3,1	1,2	20,0	5,0	20,0	4,0	0,7	2,6	0,8	2,6	50,0	0,8	0,7	0,8	0,1	1,5	20,0	20,0
285 A	H	0,2	1,4	3,1	1,3	3,0	2,0	2,4	3,6	1,1	2,6	3,0	0,7	2,2	0,2	0,8	0,0	1,1	4,7	4,9	4,0
286 A	N	0,8	2,5	1,2	1,1	2,4	4,7	2,7	2,1	0,0	0,7	1,8	0,6	20,0	1,2	0,7	0,9	1,7	2,1	5,2	2,7
287 A	A	0,6	2,6	5,8	3,3	10,4	5,4	9,1	11,3	0,0	4,4	1,3	3,6	50,0	2,6	2,3	1,0	1,9	12,5	9,1	10,4
288 A	K	0,8	2,6	2,0	1,3	3,0	3,4	3,8	2,3	1,4	1,7	2,5	0,3	50,0	0,5	1,3	0,0	0,4	2,0	4,5	3,6
289 A	T	0,3	1,9	4,7	1,1	3,1	3,6	2,9	10,5	0,4	2,7	1,6	2,1	8,2	1,2	2,0	0,0	0,4	12,0	3,9	3,2
290 A	K	1,7	2,2	0,5	0,6	3,0	1,3	3,0	3,7	1,7	2,1	3,2	0,0	50,0	0,7	2,0	0,3	1,3	3,3	5,6	3,3
291 A	P	1,6	3,1	1,8	0,5	1,9	5,5	1,8	0,1	0,5	1,5	1,2	1,2	0,7	0,0	2,9	2,2	0,9	1,3	2,6	0,9
292 A	R	1,1	2,2	3,1	0,8	5,9	4,4	8,0	5,0	0,0	1,6	2,1	1,1	8,4	0,2	0,4	1,0	1,3	4,7	8,3	5,7
293 A	E	2,2	6,5	9,0	17,9	16,3	0,0	13,2	50,0	12,8	10,3	10,3	7,2	5,5	15,1	14,5	3,5	20,0	50,0	14,5	17,1
294 A	E	1,5	2,1	2,1	0,7	8,1	2,8	3,3	2,0	2,6	1,8	2,8	1,0	50,0	1,3	1,3	0,5	0,0	3,4	11,,2	10,2

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
295 A	Q	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	0,0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0
296 A	Y	2,8	2,3	1,1	0,4	50, 0	0,0	50, 0	4,6	2,2	2,3	3,1	0,9	50, 0	0,2	1,8	1,3	4,7	4,8	18, 2	20, 0
297 A	N	0,0	6,5	8,4	5,3	20, 0	3,4	20, 0	13, 8	2,7	20, 0	4,8	9,3	50, 0	4,4	4,4	1,5	1,6	15, 5	20, 0	20, 0
298 A	S	0,8	2,4	5,7	2,2	20, 0	3,7	20, 0	6,2	0,9	9,2	1,8	3,3	50, 0	1,7	2,1	0,0	2,2	7,3	15, 6	20, 0
299 A	T	1,9	3,4	6,0	3,1	1,0	7,1	2,9	3,1	0,0	2,7	2,6	3,6	50, 0	2,2	2,5	1,1	2,2	5,4	3,6	1,4
300 A	Y	2,8	2,9	2,7	4,5	20, 0	4,0	7,5	13, 1	1,2	0,0	2,2	2,3	50, 0	3,3	4,0	2,6	1,1	1,1	11, 0	2,4
301 A	R	3,0	3,5	3,8	2,8	0,8	3,4	1,8	0,0	1,3	0,7	2,6	2,5	50, 0	2,6	2,3	2,9	1,8	0,9	9,8	1,8
302 A	V	2,7	4,6	6,7	3,9	2,8	8,9	1,2	6,9	2,7	2,0	2,2	4,8	50, 0	4,7	3,2	4,3	7,7	3,8	0,0	8,4
303 A	V	0,0	2,2	3,3	1,0	6,7	4,5	5,3	1,4	2,5	3,1	2,0	3,1	1,0	2,1	2,9	0,4	0,4	2,9	10, 9	6,2
304 A	S	0,0	12, 1	10, 8	20, 0	20, 0	6,2	20, 0	20, 0	17, 2	20, 0	11, 9	16, 6	50, 0	20, 0	16, 6	2,2	14, 2	17, 9	20, 0	20, 0
305 A	V	1,1	2,3	3,3	1,2	0,3	5,4	1,2	0,0	0,9	1,1	2,8	1,1	3,9	1,1	1,4	1,2	0,9	0,0	0,8	0,8
306 A	L	4,3	6,2	7,1	5,9	2,8	10, 4	3,4	13, 7	3,0	0,0	3,5	6,0	50, 0	5,9	9,9	6,2	5,3	11, 4	9,6	10, 3
307 A	T	1,4	3,2	3,8	2,2	6,5	5,5	4,2	0,5	0,3	4,2	3,0	2,2	0,0	1,9	1,3	1,4	0,9	1,2	6,2	6,5
308 A	V	1,8	5,5	6,5	8,0	50, 0	7,9	20, 0	4,5	20, 0	5,5	19, 4	7,6	50, 0	7,7	15, 5	0,0	0,7	5,9	50, 0	50, 0
309 A	L	1,1	2,7	0,7	0,7	1,3	4,6	2,7	0,7	1,7	1,0	2,8	0,0	1,6	0,7	1,3	1,0	0,6	0,5	5,0	2,1
310 A	H	2,0	2,6	0,9	4,1	50, 0	5,6	0,2	6,8	4,0	7,1	4,0	0,0	0,2	4,9	10, 0	2,0	2,5	6,4	50, 0	50, 0
311 A	Q	0,6	2,5	1,6	1,6	2,5	4,3	1,6	1,4	0,6	0,9	2,9	0,9	1,7	0,8	0,9	0,0	0,3	2,2	4,6	2,0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
312 A	N	5,4	5,1	5,9	1,3	20,0	0,0	20,0	10,0	3,4	4,8	3,3	7,1	50,0	2,7	3,9	4,1	3,2	11,9	20,0	20,0
313 A	W	4,6	6,4	5,5	5,6	1,1	10,8	5,0	11,0	5,8	5,2	7,6	5,4	50,0	4,8	12,9	6,0	3,8	6,6	0,0	2,6
314 A	L	2,1	2,9	4,3	2,2	5,7	6,1	7,9	5,4	0,7	0,0	1,7	2,3	50,0	1,6	1,6	3,0	4,7	6,3	8,0	6,0
315 A	D	0,3	1,4	1,5	0,1	3,3	4,2	1,9	1,8	0,8	0,5	1,8	0,6	50,0	0,0	0,7	0,0	0,9	2,4	6,2	3,7
316 A	G	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
317 A	K	0,0	14,0	18,4	17,9	50,0	5,0	50,0	20,0	8,5	12,5	12,7	20,0	15,9	17,2	13,5	2,8	9,2	20,0	50,0	50,0
318 A	E	2,0	3,0	2,7	1,7	2,7	6,7	2,6	0,0	1,1	1,6	1,3	1,7	20,0	1,4	2,6	2,2	1,3	0,0	6,1	9,5
319 A	Y	2,9	4,4	3,9	3,4	0,0	8,8	1,8	20,0	0,5	5,2	0,7	3,2	50,0	3,1	5,6	3,4	3,6	20,0	20,0	0,2
320 A	K	2,3	3,1	3,0	2,7	20,0	7,8	20,0	9,4	0,0	0,6	2,7	1,3	50,0	2,4	1,9	3,3	3,3	7,2	20,0	20,0
321 A	C	0,0	3,2	20,0	18,8	20,0	6,9	20,0	20,0	20,0	20,0	10,4	20,0	50,0	19,6	20,0	1,5	8,7	18,3	20,0	20,0
322 A	K	2,0	2,5	3,5	2,8	2,7	6,4	2,1	0,2	0,1	1,2	2,7	2,7	50,0	2,1	0,0	2,3	1,6	0,9	14,5	2,8
323A	V	1,5	2,8	7,3	11,9	20,0	8,1	20,0	6,0	9,6	20,0	4,9	8,5	50,0	13,6	20,0	2,8	1,6	0,0	20,0	20,0
324 A	S	2,0	2,1	0,6	0,0	1,9	4,9	3,9	1,5	2,8	0,7	1,9	0,9	50,0	0,8	2,9	2,7	1,9	2,1	3,8	2,5
325 A	N	2,8	3,9	8,4	3,0	20,0	8,3	20,0	0,0	7,7	20,0	6,2	1,6	13,4	0,5	20,0	3,1	0,1	1,3	20,0	20,0
326 A	K	1,0	2,7	3,0	1,6	3,7	4,1	3,1	3,2	1,7	2,4	3,7	1,2	0,0	0,6	1,4	1,0	1,9	2,6	5,6	3,6
327 A	A	0,9	2,8	5,8	3,1	20,0	6,3	16,7	14,7	2,8	20,0	2,5	5,3	20,0	1,3	4,1	0,0	5,2	13,7	20,0	20,0
328 A	L	6,0	6,3	7,0	4,1	50,0	8,6	20,0	50,0	5,7	0,0	7,1	6,0	50,0	3,7	8,2	6,6	50,0	50,0	20,0	50,0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
329 A	P	1,0	2,5	0,9	0,6	4,0	3,4	3,3	1,7	1,9	2,5	3,6	0,0	0,3	0,7	1,5	0,1	1,1	1,1	6,2	3,6
330 A	A	0,9	2,0	1,3	0,7	3,4	3,8	3,0	2,0	1,4	2,0	3,4	0,0	20,0	0,6	1,2	0,2	0,6	1,9	7,0	3,4
331 A	P	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
332 A	I	1,9	3,7	4,6	1,7	5,0	7,0	1,9	3,8	1,8	0,0	2,5	3,9	20,0	0,8	2,4	2,3	2,6	4,4	20,0	5,9
333 A	E	0,0	3,1	3,2	0,8	4,1	4,4	4,2	16,9	3,6	2,8	2,8	2,5	1,6	1,3	3,2	1,3	1,4	7,7	4,0	4,8
334 A	K	1,7	2,9	2,5	0,0	1,0	6,1	3,3	1,0	1,5	0,5	3,5	1,5	4,4	0,1	2,7	2,2	0,9	1,3	4,9	1,8
335 A	T	0,5	3,2	4,5	2,7	4,2	4,9	4,1	20,0	2,1	3,1	3,0	1,2	0,0	2,3	2,8	1,4	1,4	7,3	5,1	4,5
336 A	I	1,2	1,6	5,0	1,5	20,0	6,1	16,8	0,7	3,4	7,8	2,5	3,2	20,0	2,8	1,4	0,7	0,6	0,0	20,0	20,0
337 A	S	4,8	4,8	7,5	11,5	10,1	0,0	5,5	50,0	9,9	7,0	7,9	5,0	50,0	11,4	12,7	4,5	2,3	50,0	19,3	10,6
338 A	K	1,0	2,7	2,3	2,2	4,6	5,9	2,4	50,0	0,0	2,1	1,9	1,0	50,0	1,5	0,9	0,7	10,3	50,0	5,4	4,9
339 A	A	1,0	2,5	0,8	1,1	4,4	3,7	3,7	2,1	1,8	2,6	3,6	0,0	0,8	0,6	1,6	0,6	0,9	2,4	6,8	3,8
340 A	K	1,3	2,4	2,3	2,0	1,7	4,1	2,3	1,9	0,0	2,3	1,8	1,0	1,9	0,9	1,3	0,5	0,8	1,7	4,9	2,4
232 B	P	1,3	3,2	2,2	2,2	4,1	2,9	3,6	1,8	2,1	2,8	3,9	1,1	0,0	1,1	1,6	0,7	1,4	3,0	6,2	4,1
233 B	E	0,5	2,2	1,7	0,5	2,6	3,7	2,9	4,4	1,4	1,1	3,2	0,6	2,7	0,4	1,6	0,0	1,2	6,9	5,5	2,6
234 B	L	2,9	4,0	4,8	4,9	2,0	6,1	0,8	1,5	0,0	1,9	2,7	2,6	20,0	3,6	1,2	3,1	2,5	3,4	13,4	0,5
235 B	L	0,6	2,3	2,4	0,9	5,7	4,9	1,4	3,7	0,0	0,0	1,9	1,9	17,3	0,6	1,4	0,8	0,7	5,2	7,8	5,3
236 B	G	3,6	2,5	5,1	11,8	6,8	0,0	2,8	20,0	5,0	20,0	4,5	3,5	50,0	5,5	19,9	2,6	20,0	20,0	20,0	14,1

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
237 B	G	20, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	0,0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0
238 B	P	3,5	4,7	8,5	4,2	20, 0	9,8	20, 0	0,0	5,6	9,6	4,6	8,1	1,3	5,8	20, 0	4,9	4,4	1,3	20, 0	20, 0
239 B	S	1,0	2,5	3,4	2,0	7,2	5,7	3,1	3,1	0,6	0,0	2,0	1,9	50, 0	1,7	1,1	1,5	1,5	5,2	20, 0	5,2
240 B	V	0,1	2,3	7,0	11, 9	20, 0	6,5	20, 0	8,1	12, 7	20, 0	12, 0	7,6	0,0	11, 6	20, 0	1,2	1,9	0,8	20, 0	20, 0
241 B	F	0,0	2,0	1,4	0,8	1,0	4,0	2,0	6,5	1,1	0,6	2,3	0,2	50, 0	0,3	1,5	0,1	0,9	5,7	4,1	1,1
242 B	L	2,2	3,3	6,5	6,6	6,9	7,9	4,3	0,0	8,7	3,9	4,8	5,3	0,0	9,1	6,8	2,9	1,1	0,5	20, 0	8,7
243 B	F	0,8	2,6	19	1,7	0,8	4,9	2,0	3,6	1,2	0,8	2,5	0,0	50, 0	1,6	2,7	0,1	1,8	3,9	4,3	1,0
244 B	P	1,1	2,1	4,0	1,1	11, 9	3,5	5,4	20, 0	1,4	3,2	3,0	2,0	1,8	1,2	1,3	0,0	19, 6	20, 0	9,1	11, 0
245 B	P	3,2	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	8,6	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0	0,0	20, 0	20, 0	6,0	20, 0	50, 0	20, 0	20, 0
246 B	K	0,5	2,6	1,4	1,2	2,1	4,4	1,6	0,6	0,9	1,4	2,5	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,0	2,0	4,9	2,4
247 B	P	0,8	2,5	0,7	1,0	3,6	3,9	2,6	6,2	1,8	2,1	2,9	0,3	0,0	0,8	1,5	0,3	0,7	9,5	6,6	3,4
248 B	K	0,2	2,2	0,2	0,6	2,2	4,1	2,5	2,4	1,7	1,0	2,2	0,0	1,3	0,8	1,7	0,5	0,7	2,8	4,7	2,3
249B	D	2,8	3,3	0,0	4,6	10,1	8,2	6,5	50,0	4,6	6,2	4,4	0,5	50,0	4,7	6,3	3,5	6,1	50,0	20,0	7,2
250 B	T	0,0	2,2	4,9	2,8	20, 0	6,3	20, 0	2,2	4,3	3,2	3,0	9,2	50, 0	3,4	4,9	1,3	2,3	3,1	20, 0	20, 0
251 B	L	0,0	2,4	1,6	1,2	5,6	3,6	2,2	7,4	1,2	0,6	2,3	0,5	50, 0	0,6	1,8	0,4	2,5	8,7	8,2	5,9
252 B	M	1,3	2,4	0,8	0,0	1,8	5,7	2,3	0,6	1,6	0,6	2,5	1,0	50, 0	1,0	1,6	1,5	1,3	0,8	5,1	1,6
253 B	I	1,6	3,0	2,0	1,2	3,7	4,5	3,5	2,9	0,8	2,4	2,4	1,1	1,0	0,0	1,5	1,2	1,4	3,4	4,4	3,6

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
254 B	S	1,0	1,5	0,8	0,6	3,8	3,8	3,2	0,5	1,9	2,5	3,1	0,3	6,2	0,5	1,7	0,0	0,1	1,1	5,5	3,7
255 B	R	0,9	2,0	2,0	1,7	0,0	5,4	1,4	20,0	1,0	1,6	1,3	0,8	50,0	1,4	1,1	1,5	20,0	20,0	3,7	0,8
256 B	T	0,6	2,0	1,8	1,1	2,5	3,7	1,9	1,6	1,0	1,4	2,2	0,0	1,2	0,5	0,1	0,8	1,2	1,2	5,5	2,4
257 B	P	2,5	20,0	20,0	20,0	50,0	9,0	50,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	0,0	20,0	20,0	4,8	20,0	20,0	50,0	50,0
258 B	E	1,5	2,4	2,7	1,4	2,7	6,4	4,2	0,0	0,2	5,4	2,4	1,1	50,0	1,3	2,5	2,2	1,1	1,0	19,1	3,0
259 B	V	2,9	4,2	6,3	5,2	20,0	9,3	20,0	0,0	8,1	8,9	5,5	5,6	50,0	6,2	20,0	4,5	2,5	0,0	20,0	20,0
260 B	T	0,0	1,6	5,3	1,9	20,0	4,9	20,0	0,6	1,1	2,8	1,4	3,9	0,2	2,3	2,6	0,4	0,1	2,7	20,0	20,0
261 B	C	0,0	10,0	20,0	20,0	20,0	2,6	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	2,0	16,6	20,0	20,0	20,0
262 B	V	2,1	2,4	2,7	2,4	8,1	7,2	3,8	1,8	3,5	8,6	3,4	2,7	50,0	3,2	4,8	2,9	1,9	0,0	14,7	9,1
263 B	V	2,2	3,7	4,7	11,2	20,0	9,1	20,0	15,0	13,7	2,8	20,0	5,4	50,0	13,0	20,0	3,6	2,1	0,0	20,0	20,0
264 B	V	2,1	3,0	4,6	2,7	8,6	6,8	6,6	0,0	1,8	1,8	3,7	3,6	10,1	3,0	2,2	2,6	2,2	1,0	12,7	20,0
265 B	D	4,5	5,2	4,8	4,7	5,0	0,0	3,8	8,5	1,8	2,6	4,1	1,8	50,0	4,5	5,3	4,5	6,0	9,2	12,2	5,6
266 B	V	5,3	5,5	7,2	12,7	20,0	12,0	20,0	2,1	20,0	20,0	20,0	5,7	50,0	18,3	20,0	5,9	4,7	0,0	50,0	50,0
267 B	S	2,8	4,3	6,2	3,8	0,0	7,4	1,0	50,0	1,0	0,3	3,2	3,2	0,5	1,5	0,8	3,3	11,6	50,0	6,3	50,0
268 B	H	2,6	3,7	5,1	4,1	4,9	6,0	1,8	2,6	0,0	2,5	3,8	2,6	3,4	2,1	1,8	2,5	3,8	2,7	7,8	5,5
269 B	E	0,4	2,4	1,7	0,8	2,8	3,7	2,6	1,0	1,0	1,6	3,0	0,0	12,8	0,5	0,7	0,3	0,7	0,6	5,1	2,7
270 B	D	0,0	1,6	1,1	7,3	4,8	4,3	2,6	20,0	3,8	14,5	3,8	1,2	5,9	6,3	2,1	0,3	1,9	5,4	16,3	5,6

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
271 B	P	1,1	3,3	5,6	3,4	4,1	5,5	4,2	20,0	1,9	3,6	3,9	3,3	7,4	2,7	0,0	1,5	2,2	5,2	4,8	4,4
272 B	Q	0,9	1,9	1,0	0,6	3,0	3,9	2,9	1,5	1,7	2,2	3,5	0,6	4,9	0,0	1,4	0,2	0,6	1,4	3,9	3,2
273 B	V	3,5	4,8	6,2	8,3	20,0	9,2	20,0	4,6	8,4	3,1	3,5	7,4	50,0	10,6	20,0	2,0	0,0	4,8	20,0	20,0
274 B	K	0,1	1,6	0,4	0,9	1,7	3,8	1,8	1,9	0,4	0,5	2,4	0,3	15,6	0,1	0,0	0,0	0,2	1,6	2,2	1,9
275 B	F	5,7	7,0	8,4	9,2	0,0	11,2	3,5	9,2	7,9	5,7	5,1	7,0	4,1	9,7	12,3	6,9	4,5	3,3	10,3	5,0
276 B	N	0,0	6,2	6,9	6,4	20,0	4,7	12,1	20,0	9,3	10,0	7,4	3,8	50,0	6,4	9,2	2,8	20,0	20,0	20,0	20,0
277 B	W	8,3	10,0	10,6	9,2	2,6	14,2	7,4	12,7	6,7	7,4	6,4	10,8	6,8	9,3	11,9	9,7	8,0	14,4	0,0	15,9
278 B	Y	0,0	2,3	17,4	4,0	50,0	5,1	50,0	20,0	2,8	20,0	2,1	12,6	11,0	4,4	2,0	0,8	2,5	19,8	20,0	4,2
279 B	V	3,1	3,5	4,2	2,9	20,0	8,5	13,9	0,4	0,0	2,9	2,0	3,4	20,0	1,4	4,0	4,2	2,4	1,2	20,0	20,0
280 B	D	0,5	3,0	2,1	1,5	6,7	3,1	4,7	12,6	2,9	1,6	2,9	1,6	20,0	1,4	3,1	0,0	2,7	5,5	8,1	7,3
281 B	G	5,6	5,8	5,5	4,8	7,9	0,0	7,2	6,5	5,3	5,7	7,1	3,4	50,0	4,0	5,3	3,6	3,2	6,4	10,3	7,6
282 B	V	0,4	1,9	1,1	0,6	2,9	4,1	2,1	1,3	1,0	1,4	2,9	0,2	50,0	0,0	0,7	0,0	0,4	0,7	6,1	2,8
283 B	E	0,6	1,9	4,3	1,7	6,7	4,2	5,2	2,9	0,5	4,4	0,3	2,5	0,0	1,5	1,6	1,0	1,5	3,9	7,9	6,7
284 B	V	0,4	2,4	2,5	1,1	20,0	5,9	20,0	1,1	1,2	6,2	0,8	2,4	50,0	1,5	3,3	0,0	1,5	1,8	20,0	20,0
285B	H	1,3	2,4	2,1	1,7	2,4	3,4	1,2	1,8	0,7	2,3	2,7	0,0	1,6	0,9	0,8	0,5	0,4	2,0	5,8	2,4
286 B	N	1,2	2,7	1,0	1,1	3,0	3,1	2,6	0,8	2,0	1,9	2,9	0,0	50,0	0,4	1,6	1,1	0,5	2,9	4,9	3,0
287 B	A	2,5	4,4	6,1	7,5	0,0	8,2	3,0	10,2	5,1	16,5	4,5	0,3	12,3	8,1	9,1	4,1	3,3	7,1	3,4	0,8

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
288 B	K	0,4	1,9	1,9	0,0	2,9	3,5	2,9	2,5	1,8	2,1	2,5	0,9	15,4	0,6	1,1	0,2	0,9	3,8	5,9	2,7
289 B	T	0,1	1,5	3,7	1,4	2,7	3,9	2,6	1,8	0,0	2,2	1,6	1,5	1,8	1,1	1,7	0,0	0,4	2,3	3,4	2,5
290 B	K	0,9	1,8	0,8	0,5	2,4	0,8	2,7	3,0	1,3	1,3	2,6	0,2	50,0	0,7	1,5	0,0	0,6	2,9	5,0	2,7
291 B	P	1,2	2,1	2,5	0,5	3,9	4,6	3,4	0,7	0,0	3,4	1,5	1,1	0,6	0,1	1,1	1,1	0,9	1,5	3,2	2,6
292 B	R	0,8	2,6	3,3	1,2	4,9	3,6	6,8	3,1	2,0	2,4	2,2	2,2	16,6	1,5	1,8	0,1	0,0	3,2	7,6	5,2
293 B	E	0,0	3,0	4,1	2,8	7,3	3,6	5,8	5,8	2,6	4,5	3,2	2,2	1,3	2,2	2,5	0,0	1,2	7,8	7,0	6,9
294 B	E	2,5	3,3	3,9	2,3	8,3	6,8	4,4	5,6	3,6	2,3	3,7	4,1	0,0	3,3	5,0	2,1	2,9	5,0	6,7	11,9
295 B	Q	1,1	2,2	1,9	0,6	3,8	2,8	3,1	8,0	1,4	2,2	3,4	1,0	0,4	0,4	1,1	0,0	3,9	6,6	6,1	3,5
296 B	Y	1,5	2,7	1,2	1,2	4,1	4,1	3,5	1,1	1,8	2,7	3,5	0,0	20,0	0,6	1,9	1,2	1,4	1,3	6,4	4,0
297 B	N	3,9	4,5	10,1	6,0	15,5	7,3	16,7	6,6	0,0	5,1	4,6	7,3	20,0	4,4	4,2	3,6	4,1	7,9	18,0	15,0
298 B	S	1,7	2,5	3,5	2,5	2,5	3,7	2,4	3,0	0,0	1,8	2,3	0,4	50,0	1,2	1,0	0,9	2,2	3,3	5,5	2,0
299 B	T	0,0	2,7	7,2	11,1	20,0	4,8	20,0	7,5	6,9	20,0	7,1	4,8	50,0	9,8	17,9	0,3	1,3	5,8	20,0	20,0
300 B	Y	3,8	5,2	8,0	4,3	20,0	8,6	20,0	12,2	0,0	4,3	3,2	6,5	50,0	4,0	3,8	4,3	3,6	9,1	20,0	6,4
301 B	R	1,2	1,8	2,3	1,1	20,0	5,8	11,3	5,2	0,3	5,0	2,0	1,6	14,1	0,6	0,4	1,8	1,1	0,0	17,9	20,0
302 B	V	3,5	4,8	5,5	3,7	0,2	9,6	1,1	0,5	2,6	3,5	2,5	4,7	9,6	4,1	0,6	4,3	2,0	0,0	20,0	0,2
303 B	V	0,2	0,0	0,1	1,0	20,0	5,0	13,3	5,1	1,7	10,4	1,9	2,0	8,6	2,0	4,7	0,6	0,5	1,3	20,0	20,0
304B	S	1,5	2,3	8,2	20,0	20,0	7,6	20,0	7,6	20,0	20,0	20,0	6,3	50,0	20,0	20,0	0,0	2,7	3,8	20,0	20,0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
304 B	S	1,5	2,3	8,2	20, 0	20, 0	7,6	20, 0	7,6	20, 0	20, 0	20, 0	6,3	50, 0	20, 0	20, 0	0,0	2,7	3,8	20, 0	20, 0
305 B	V	0,1	1,2	3,3	1,1	20, 0	4,6	20, 0	3,2	1,1	11, 0	1,5	1,8	50, 0	0,6	2,0	0,6	0,0	0,7	20, 0	20, 0
306 B	L	4,7	6,8	6,3	4,3	10, 4	11, 1	7,8	4,2	3,0	0,0	3,8	5,7	13, 4	4,4	14, 1	5,5	4,3	6,0	20, 0	12, 1
307 B	T	1,5	3,0	2,7	1,7	4,1	5,2	3,0	1,6	1,9	3,1	3,4	1,7	0,0	1,7	1,9	1,5	1,4	2,0	4,4	4,3
308 B	V	0,0	0,6	7,6	20, 0	20, 0	6,6	20, 0	20, 0	16, 1	15, 1	20, 0	12, 4	50, 0	20, 0	20, 0	1,2	3,6	4,3	20, 0	20, 0
309 B	L	1,4	3,0	2,2	1,1	3,0	6,0	3,5	20, 0	2,4	1,7	3,6	0,2	0,0	1,6	2,3	1,8	14, 3	20, 0	5,1	3,3
310 B	H	2,4	2,9	2,7	4,9	20, 0	6,8	4,4	4,8	3,1	15, 0	3,4	0,0	2,3	4,6	7,0	1,8	1,6	3,8	20, 0	20, 0
311 B	Q	0,0	2,2	1,3	0,7	2,1	3,3	2,4	12, 6	0,6	0,9	2,3	0,6	3,2	0,4	0,8	0,2	1,6	18, 8	4,6	2,0
312 B	N	0,0	1,0	0,2	0,3	6,0	5,4	2,3	12, 0	2,1	2,9	1,6	0,9	50, 0	1,3	5,7	0,1	5,6	3,8	8,0	7,8
313 B	W	5,3	6,6	7,3	5,4	0,0	11, 4	6,2	20, 0	4,0	5,2	4,3	8,0	50, 0	6,5	8,9	6,6	17, 2	20, 0	2,1	0,9
314 B	L	1,7	2,2	3,1	0,0	6,4	5,6	1,5	2,1	0,6	0,2	1,1	1,9	50, 0	0,8	1,0	1,7	0,9	3,1	3,7	11, 3
315 B	D	1,4	2,3	2,4	0,7	6,0	5,5	2,3	4,8	2,2	1,0	2,9	1,8	50, 0	1,0	2,2	0,2	0,0	4,5	8,5	6,8
316 B	G	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	0,0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0
317 B	K	0,9	2,3	4,3	2,8	1,2	4,0	0,6	13, 9	0,0	4,8	1,6	1,3	50, 0	4,2	0,9	0,4	13, 8	10, 1	20, 0	1,7
318 B	E	0,7	1,2	3,1	1,0	7,0	5,1	8,2	0,4	1,0	5,7	1,7	2,3	3,8	1,0	1,6	0,4	0,0	1,0	3,8	7,7
319 B	Y	6,5	7,1	8,5	8,8	0,0	12, 5	3,9	3,1	5,2	5,4	8,4	7,2	50, 0	9,0	13, 7	7,2	5,8	3,9	20, 0	1,7
320 B	K	3,1	4,3	7,3	4,3	20, 0	8,6	15, 0	1,4	0,0	11, 6	3,6	6,6	50, 0	2,9	2,4	4,0	3,3	2,0	20, 0	20, 0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
321B	C	0,0	6,5	20,0	20,0	20,0	6,6	20,0	20,0	20,0	200	20,0	20,0	19,7	20,0	20,0	3,1	11,0	20,0	20,0	20,0
322 B	K	2,3	3,2	3,5	1,8	20, 0	7,9	20, 0	1,1	0,6	4,9	3,7	2,2	50, 0	0,9	0,3	3,3	1,6	0,0	20, 0	20, 0
323 B	V	4,0	4,6	6,9	8,1	20, 0	10, 6	20, 0	9,0	17, 1	7,9	8,1	10, 5	50, 0	8,7	20, 0	5,6	4,6	0,0	20, 0	20, 0
324 B	S	1,3	3,0	1,4	0,0	2,1	6,0	4,4	1,3	2,4	0,6	2,7	2,2	50, 0	1,3	3,6	1,5	1,6	1,8	3,6	2,4
325 B	N	3,4	5,1	9,0	4,7	20, 0	8,2	20, 0	16, 6	16, 6	20, 0	20, 0	0,0	50, 0	6,3	20, 0	4,6	8,8	17, 8	20, 0	20, 0
326 B	K	0,3	2,1	2,0	0,9	1,0	3,5	2,0	2,9	0,9	2,9	2,8	0,1	4,4	0,0	1,1	0,1	3,2	2,1	5,2	0,7
327 B	A	1,9	3,3	4,7	3,5	20, 0	7,0	20, 0	20, 0	0,3	0,0	1,9	1,9	20, 0	3,0	2,3	3,3	20, 0	20, 0	20, 0	20, 0
328 B	L	3,7	3,6	3,8	4,4	50, 0	8,4	7,0	50, 0	3,8	0,0	2,6	4,0	50, 0	4,2	8,7	4,8	2,9	12, 3	50, 0	50, 0
329 B	P	3,3	8,5	20, 0	20, 0	50, 0	8,0	16, 5	50, 0	18, 5	20, 0	14, 7	20, 0	0,0	20, 0	20, 0	1,4	17, 1	16, 4	50, 0	50, 0
330 B	A	0,5	2,0	2,8	0,5	2,4	3,9	1,2	4,0	0,0	2,0	2,1	0,8	20, 0	0,0	0,5	0,8	0,2	4,6	8,2	2,6
331 B	P	1,7	3,8	6,4	10, 1	20, 0	4,7	11, 0	10, 1	7,5	20, 0	5,5	5,0	0,0	7,6	7,4	2,6	20, 0	10, 1	17, 6	20, 0
332 B	I	1,7	2,9	1,3	1,7	14, 8	7,0	13, 9	1,7	3,1	0,0	1,7	1,7	50, 0	1,8	5,3	2,0	1,9	3,4	20, 0	20, 0
333 B	E	1,9	2,5	1,9	0,0	8,9	5,9	8,2	1,2	3,0	6,4	3,4	2,0	3,1	1,1	2,3	1,8	1,6	1,6	8,9	9,3
334 B	K	2,9	3,9	3,7	2,6	20, 0	8,3	12, 1	1,5	2,6	5,3	3,7	4,3	50, 0	1,9	0,0	3,4	1,8	1,4	9,9	20, 0
335 B	T	0,0	2,1	7,2	7,0	4,2	0,4	3,3	17, 3	6,5	7,7	5,2	5,5	3,5	7,0	5,7	0,2	5,5	11, 5	5,2	3,1
336 B	I	0,5	1,6	2,1	0,7	20, 0	5,0	6,1	0,0	1,3	5,3	2,1	1,8	20, 0	0,6	3,1	1,1	0,8	0,7	19, 4	20, 0
337 B	S	1,1	2,1	4,0	2,0	3,1	3,2	2,0	50, 0	0,0	1,6	0,9	1,9	15, 8	1,1	2,2	1,4	50, 0	50, 0	5,5	3,9

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
338 B	K	0,6	2,3	3,0	3,0	9,4	5,3	10,6	2,2	1,1	0,0	3,2	1,5	16,2	2,7	2,7	1,1	2,8	3,5	8,1	11,0
339 B	A	1,1	2,4	1,2	0,8	4,3	3,6	3,7	2,6	1,8	2,6	3,5	0,0	2,3	0,5	1,3	0,2	0,8	2,0	6,7	3,8
340b	K	0,9	2,0	1,4	0,8	3,0	3,4	2,9	2,1	0,8	2,5	2,3	0,2	1,0	0,1	1,2	0,0	0,5	2,0	5,5	3,2

Tecnología SPA™; estructura de molde 1IIS; - carbohidrato, sin posiciones flotantes

Tabla 56

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	0,2	4,6	2,7	0,0	20,0	4,6	14,5	11,0	1,9	0,3	2,0	1,9	8,1	1,4	2,6	0,4	5,7	11,6	20,0	20,0
240 A	V	1,5	2,4	2,4	6,9	20,0	7,4	20,0	5,1	9,9	5,9	5,5	2,4	1,1	12,3	13,1	2,6	0,5	0,0	20,0	20,0
263 A	V	2,3	2,8	6,3	16,5	20,0	8,8	20,0	9,6	7,3	7,3	15,3	4,8	50,0	16,4	17,4	2,8	1,4	0,0	20,0	20,0
264 A	V	1,8	3,1	2,6	1,8	0,0	6,3	1,9	0,6	2,4	0,8	2,7	2,1	1,6	2,3	2,7	2,3	1,1	0,5	3,5	0,0
266 A	V	4,9	5,2	6,9	12,3	20,0	11,1	20,0	0,8	11,9	20,0	8,5	6,6	50,0	12,5	20,0	6,1	3,7	0,0	20,0	20,0
296 A	Y	3,4	2,7	1,1	0,0	50,0	0,7	50,0	5,0	3,6	3,5	4,2	0,9	50,0	0,9	2,9	2,2	5,3	5,5	16,1	18,4
299 A	T	0,7	3,2	9,9	10,4	20,0	6,2	20,0	10,7	6,7	20,0	4,1	12,9	50,0	5,9	11,8	0,0	2,5	8,2	13,3	20,0
325	N	2,5	3,5	7,7	2,5	20,0	8,0	20,0	0,0	6,1	20,0	7,8	1,2	12,8	0,8	20,0	2,7	0,0	1,0	20,0	20,0
328 A	L	6,1	6,3	7,1	4,2	50,0	8,8	20,0	50,0	4,6	0,0	7,2	6,1	50,0	4,0	8,3	6,7	50,0	50,0	20,0	50,0
330 A	A	0,9	1,8	1,2	0,0	2,5	4,0	2,9	1,7	1,2	1,6	2,8	0,0	20,0	0,4	1,0	0,2	0,5	1,7	6,2	2,9
332 A	I	1,9	3,8	4,6	1,3	5,1	7,1	1,8	3,4	0,2	0,0	2,6	3,8	20,0	0,6	2,4	2,3	2,5	4,2	20,0	5,6

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 B	S	1,0	2,4	3,5	2,0	6,7	5,6	2,9	3,1	0,3	0,0	1,9	2,1	50,0	1,5	1,8	1,4	1,4	5,2 ,	20,0	4,2
240 B	V	0,3	2,4	6,9	11,7	20,0	6,6	20,0	8,3	12,3	20,0	14,2	7,4	0,0	13,4	20,0	1,3	1,9	0,9	20,0	20,0
263 B	V	2,4	3,9	4,5	12,5	20,0	9,3	20,0	15,8	17,1	2,1	20,0	5,3	50,0	13,8	20,0	3,9	2,2	0,0	20,0	20,0
264 B	V	2,2	3,2	4,8	2,7	7,4	6,9	6,0	0,0	1,9	1,9	3,8	3,7	9,9	3,1	2,2	2,7	2,4	0,9	14,7	18,2
266 B	V	5,4	5,5	7,5	13,2	20,0	12,1	20,0	2,6	20,0	20,0	20,0	5,4	50,0	16,1	20,0	6,0	4,7	0,0	50,0	50,0
296 B	Y	1,5	2,7	1,3	1,2	4,0	4,1	3,6	1,1	1,9	2,6	3,5	0,0	20,0	0,7	1,8	1,1	1,4	1,3	6,5	4,2
299B	T	0,0	2,2	7,5	10,2	20,0	4,8	20,0	7,7	5,8	20,0	10,3	5,1	50,0	10,2	18,4	0,3	1,1	5,4	20,0	20,0
325 B	N	3,4	5,1	8,6	5,0	20,0	8,2	20,0	16,7	20,0	20,0	20,0	0,0	19,7	6,3	20,0	4,6	8,6	18,2	20,0	20,0
328 B	L	3,6	3,5	3,8	3,9	50,0	8,3	7,0	50,0	2,9	0,0	1,9	3,8	50,0	3,4	8,4	4,7	2,9	12,5	50,0	50,0
330 B	A	0,7	2,1	2,9	0,7	2,7	4,0	1,4	4,8	0,0	2,2	2,3	0,8	20,0	0,2	0,8	1,1	0,2	4,7	7,8	3,2
332 B	I	1,8	2,9	1,2	1,8	13,5	7,0	9,9	1,7	3,2	0,0	1,7	1,9	50,0	1,2	5,4	2,0	2,0	3,3	20,0	20,0

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato

Tabla 57

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1,2	3,5	1,7	0,0	20,0	5,8	11,0	6,6	2,9	3,9	3,9	2,7	8,5	1,3	2,7	0,6	3,5	5,4	20,0	20,0
240 A	V	1,2	2,4	6,0	14,0	20,0	7,1	20,0	6,7	9,4	10,1	7,5	4,4	1,8	14,8	20,0	2,0	0,4	0,0	20,0	20,0
263 A	V	0,0	0,4	1,0	8,7	20,0	6,9	4,4	11,7	4,9	16,0	19,2	0,8	50,0	11,7	20,0	1,4	0,1	1,0	20,0	20,0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
264 A	V	2,9	3,7	6,3	2,8	11, 6	7,6	13, 2	0,0	3,2	3,4	4,1	4,2	7,1	2,9	3,4	3,1	1,9	0,8	12, 8	16, 3
266 A	V	4,8	5,9	6,8	9,5	50, 0	10, 3	20, 0	3,5	12, 7	12, 2	12, 7	4,1	50, 0	11, 9	11, 9	5,2	2,9	0,0	50, 0	50, 0
296 A	Y	0,8	2,0	1,5	0,1	0,2	3,4	1,5	6,6	1,7	0,6	1,8	1,2	2,6	0,0	1,6	0,2	2,5	5,6	3,8	0,0
299 A	T	1,9	3,7	7,5	0,0	20, 0	7,9	14, 2	2,9	0,8	3,4	4,4	2,3	50, 0	1,9	3,0	3,5	4,1	3,3	20, 0	20, 0
325 A	N	1,0	1,4	3,1	2,8	20, 0	7,4	20, 0	8,5	7,7	10, 4	6,1	2,8	15, 4	5,4	20, 0	0,0	0,1	3,8	20, 0	20, 0
328 A	L	2,5	5,3	4,0	1,9	50, 0	7,5	20, 0	20, 0	1,6	0,2	0,0	2,9	50, 0	0,4	4,8	3,2	2,9	7,0	50, 0	50, 0
330 A	A	0,9	2,1	1,8	1,2	2,4	2,7	3,1	3,1	1,4	2,1	3,5	0,5	20, 0	0,8	1,0	0,0	0,5	2,9	5,2	2,9
332 A	I	2,9	3,7	3,9	0,9	6,1	7,8	2,5	0,0	2,7	0,8	2,8	3,5	50, 0	0,7	3,7	2,9	2,5	1,0	8,1	6,9
239 B	S	1,9	3,1	3,0	1,9	1,5	6,2	2,3	14, 1	1,8	1,4	2,9	1,8	0,0	1,9	3,2	1,9	2,3	7,7	6,6	15, 8
240 B	V	0,5	1,7	5,0	13, 3	20, 0	6,6	20, 0	1,2	12, 4	12, 1	8,8	4,6	6,3	20, 0	20, 0	1,0	0,2	0,0	20, 0	20, 0
263 B	V	2,9	3,2	6,4	18, 2	10, 1	9,2	6,9	12, 8	6,0	20, 0	10, 3	5,7	50, 0	17, 5	20, 0	3,2	2,2	0,0	20, 0	20, 0
264 B	V	2,9	3,6	4,4	3,0	8,8	7,1	6,2	0,0	2,3	1,9	4,5	3,4	1,7	3,2	3,5	3,5	2,0	0,9	12, 0	16, 4
266 B	V	4,4	4,6	2,6	6,6	20, 0	10, 7	20, 0	0,0	4,9	1,7	8,5	5,6	50, 0	6,0	12, 4	5,3	4,6	1,5	20, 0	50, 0
296 B	Y	0,0	7,1	6,7	7,2	20, 0	0,1	18, 6	50, 0	7,0	2,7	6,6	6,8	50, 0	7,2	9,3	2,3	50, 0	50, 0	20, 0	14, 1
299B	T	0,0	3,2	10,4	6,0	20,0	5,5	20,0	15,9	3,2	5,9	4,4	6,4	50,0	5,7	9,4	1,2	1,4	13,7	20,0	20,0
325 B	N	1,4	2,5	5,0	0,0	20, 0	7,0	20, 0	20, 0	1,0	2,2	1,0	0,3	1,9	1,1	20, 0	2,6	5,1	20, 0	20, 0	20, 0
328 B	L	0,4	1,3	5,6	0,0	50, 0	4,5	50, 0	50, 0	1,9	2,4	2,4	8,3	50, 0	0,8	16, 4	1,0	1,2	50, 0	50, 0	50, 0

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
330 B	A	0,6	1,4	2,5	0,9	3,1	2,5	1,2	20,0	0,0	2,4	2,1	0,3	20,0	0,4	0,6	0,0	4,0	20,0	13,5	3,4
332 B	I	4,3	5,3	5,7	0,0	11,4	9,3	4,3	2,5	5,8	2,0	4,0	6,5	17,9	3,7	5,9	4,6	4,2	3,7	20,0	11,6

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato

Tabla 58

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1,2	2,3	2,2	1,8	7,9	5,5	7,6	0,5	0,2	1,8	2,6	1,4	0,9	1,3	1,9	1,5	0,8	0,0	8,6	9,6
240 A	V	0,7	2,9	6,8	4,3	20,0	6,5	20,0	0,0	10,7	20,0	3,1	9,1	2,1	7,7	20,0	1,4	1,1	2,4	20,0	20,0
263 A	V	1,7	2,9	4,6	18,8	20,0	8,4	5,8	15,1	2,3	14,5	2,1	3,2	50,0	20,0	15,0	3,6	1,2	0,0	20,0	20,0
264 A	V	2,7	3,3	3,6	1,5	13,9	6,7	5,9	0,0	2,3	4,9	3,7	3,2	1,9	2,5	3,0	3,0	2,5	0,7	19,9	19,0
266 A	V	3,5	3,5	5,7	12,4	20,0	10,0	20,0	5,7	6,3	7,8	7,4	5,2	50,0	16,6	20,0	4,2	1,7	0,0	20,0	50,0
296 A	Y	2,6	50,0	50,0	50,0	50,0	0,0	50,0	50,0	18,5	18,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	13,6
299 A	T	0,2	0,7	6,6	1,2	20,0	5,6	9,6	1,6	0,8	1,5	1,8	4,8	50,0	1,0	9,2	0,0	0,0	1,6	20,0	20,0
325 A	N	3,1	3,6	7,3	2,4	20,0	7,7	20,0	20,0	20,0	10,0	13,1	3,6	50,0	0,0	20,0	4,0	9,7	20,0	20,0	20,0
328 A	L	0,6	0,0	1,5	5,4	50,0	1,6	50,0	50,0	3,1	4,2	9,6	1,4	50,0	6,9	9,6	0,6	0,1	50,0	50,0	50,0
330 A	A	1,9	2,5	4,1	2,8	4,5	4,1	3,0	3,2	1,0	2,7	3,5	2,1	20,0	2,4	2,6	1,3	0,0	3,9	7,6	5,3
332 A	I	2,3	3,5	2,2	0,8	20,0	6,8	9,6	0,0	3,4	0,2	2,6	2,8	14,5	3,3	4,6	2,6	1,3	0,9	10,5	20,0
239 B	S	1,4	3,6	2,5	1,4	16,8	5,8	6,2	5,0	2,5	1,4	2,0	3,8	0,3	0,5	2,4	0,0	1,6	5,3	20,0	19,5

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
240 B	V	0,0	2,6	12, 8	18, 6	20, 0	5,7	20, 0	12, 7	10, 4	20, 0	8,5	15, 1	3,1	20, 0	20, 0	1,0	0,2	2,4	20, 0	20, 0
263 B	V	1,1	2,4	3,6	20, 0	20, 0	7,8	17, 7	11, 8	4,5	20, 0	6,3	3,3	50, 0	20, 0	20, 0	3,2	1,2	0,0	20, 0	20, 0
264 B	V	3,3	4,0	5,0	2,9	14, 2	7,5	4,8	0,0	2,6	3,6	4,6	3,5	1,7	3,1	4,1	3,9	2,9	1,3	6,9	20, 0
266 B	V	2,9	3,3	4,9	11, 3	50, 0	9,5	20, 0	20, 0	20, 0	7,9	15, 0	4,5	50, 0	4,9	20, 0	1,9	0,0	3,6	50, 0	50, 0
296 B	Y	2,8	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	0,0	50, 0	50, 0	17, 7	18, 7	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	50, 0	11, 3
299B	T	0,0	3,8	12,6	9,2	20,0	5,9	20,0	7,3	4,8	3,2	4,3	8,0	50,0	12,3	8,8	0,2	2,1	4,4	20,0	20,0
325 B	N	0,3	2,0	5,5	2,2	50, 0	6,1	20, 0	0,0	10, 5	15, 5	14, 6	1,3	10, 0	2,4	20, 0	2,3	2,0	1,0	20, 0	50, 0
328 B	L	5,4	5,7	7,3	4,4	50, 0	9,8	20, 0	50, 0	2,5	0,0	5,1	5,9	50, 0	2,8	7,4	6,1	6,4	50, 0	50, 0	50, 0
330 B	A	0,6	1,4	3,2	1,3	3,9	3,2	2,7	4,0	1,3	3,7	3,1	0,7	20, 0	0,6	1,3	0,0	0,4	4,2	8,2	3,6
332 B	I	1,9	3,1	2,7	1,7	5,2	6,9	3,1	0,4	1,3	0,0	1,9	2,6	7,7	1,3	2,2	2,3	1,6	2,0	10, 4	5,6

Tecnología SPA™; estructura de molde D129G 1IIS; + carbohidrato

Tabla 59

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
239 A	S	1,4	2,6	3,1	1,0	20, 0	5,7	4,8	3,4	2,0	1,2	2,6	1,6	4,8	0,0	2,1	1,3	2,1	3,3	13, 8	19, 6
240 A	V	2,9	3,5	3,7	4,6	20, 0	8,2	10, 8	0,0	9,1	3,2	5,4	3,1	4,8	5,5	17, 5	4,0	1,8	1,2	20, 0	20, 0
263 A	V	3,6	4,9	6,2	8,7	20, 0	9,9	20, 0	3,7	4,2	0,5	6,7	6,1	50, 0	9,5	20, 0	5,1	3,6	0,0	20, 0	20, 0
264 A	V	1,8	2,8	3,3	2,0	2,9	6,2	3,1	0,0	2,4	0,8	3,0	2,4	6,1	1,4	2,8	2,4	1,9	0,8	10, 2	2,2

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
266 A	V	4,4	5,2	4,9	7,1	20, 0	10, 6	20, 0	1,0	12, 1	4,8	9,1	4,6	50, 0	7,9	12, 6	5,8	3,5	0,0	20, 0	20, 0
296 A	Y	1,2	2,9	0,7	1,4	3,1	3,9	2,7	2,4	2,3	1,9	2,2	0,0	1,6	1,4	3,0	0,9	1,0	3,5	6,0	2,6
299 A	T	0,0	2,6	6,0	11, 5	20, 0	5,3	20, 0	20, 0	6,0	20, 0	4,4	3,0	50, 0	14, 1	13, 2	0,9	3,8	15, 1	15, 0	20, 0
325 A	N	5,2	7,0	6,6	6,9	50, 0	11, 3	20, 0	1,3	14, 3	13, 5	13, 9	0,0	5,0	6,0	20, 0	6,0	4,6	3,2	20, 0	50, 0
328 A	L	4,8	5,5	7,0	3,2	20, 0	10, 5	20, 0	50, 0	5,1	0,0	8,5	5,5	50, 0	3,5	8,2	5,5	13, 4	50, 0	20, 0	50, 0
330 A	A	0,9	1,8	1,1	0,9	3,5	4,0	3,0 '	2,3	1,2	1,6	2,8	0,0	14, 5	0,9	1,1	0,1	0,4	2,0	6,4	3,2
332 A	I	5,3	6,4	6,7	4,8	8,2	9,9	5,2	3,1	0,0	3,6	5,2	6,8	20, 0	3,5	4,6	5,5	4,8	4,0	11, 2	7,1
239 B	S	0,7	2,3	2,6	2,0	5,3	5,1	3,3	1,7	0,0	0,0	2,0	0,8	15, 5	0,9	0,8	0,7	0,7	3,3	8,2	6,0
240 B	V	2,3	3,0	4,1	7,3	20, 0	8,1	20, 0	5,1	20, 0	11, 8	10, 9	3,8	2,0	17, 0	20, 0	3,6	1,3	0,0	20, 0	20, 0
263 B	V	3,2	4,3	7,3	8,3	20, 0	9,6	20, 0	13, 3	8,5	0,6	20, 0	6,0	50, 0	8,5	20, 0	4,6	4,0	0,0	20, 0	20, 0
264 B	V	2,1	3,2	3,7	2,7	17, 8	6,6	11, 5	0,0	2,0	0,8	3,5	3,0	7,8	2,0	1,5	2,5	1,3	1,0	13, 9	20, 0
266 B	V	5,0	5,0	5,2	16, 3	20, 0	11, 2	20, 0	2,3	20, 0	14, 3	17, 3	2,5	50, 0	11, 6	20, 0	5,4	3,9	0,0	20, 0	20, 0
296 B	Y	0,9	2,3	1,0	0,5	2,7	3,7	2,5	1,2	1,3	2,1	3,0	0,0	7,0	0,4	1,1	0,3	0,8	1,8	6,0	2,4
299B	T	1,1	2,2	7,6	5,4	20,0	6,4	12,8	1,8	3,9	17,5	6,9	3,9	20,0	4,6	10,3	0,8	0,0	1,9	20,0	20,0
325 B	N	10, 1	11, 5	13, 1	11, 2	20, 0	15, 7	20, 0	8,6	14, 3	17, 1	20, 0	0,0	16, 1	10, 6	20, 0	11, 1	10, 9	10, 5	20, 0	20, 0
328 B	L	2,9	4,1	4,8	3,5	50, 0	8,5	1,7	9,6	1,5	0,0	1,5	3,5	50, 0	3,3	2,0	3,3	1,9	5,2	50, 0	50, 0
330 B	A	0,1	2,0	1,4	1,8	1,6	4,0	3,0	2,0	0,5	0,5	2,6	0,0	20, 0	0,7	2,0	0,3	0,6	2,1	4,4	2,4

ES 2 562 177 T3

Pos	TS	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
332 B	I	3,4	4,4	3,5	3,1	6,1	8,2	4,1	0,0	3,3	1,3	3,3	4,0	15,7	0,8	2,1	3,9	2,7	1,1	20,0	6,1
Tecnología SPA™; estructura de molde del modelo Fc/FcγRIIb D129G 1IIS; - carbohidrato																					

Los resultados de los cálculos de diseño presentados en las Tablas 1 - 59 anteriores se usaron para construir una serie de bibliotecas variantes de Fc para la producción y exploración experimental. Las bibliotecas experimentales se diseñaron en rondas sucesivas de exploración computacional y experimental. El diseño de bibliotecas de Fc posteriores se benefició de la retroalimentación de las bibliotecas anteriores, y por lo tanto comprendía típicamente combinaciones de variantes de Fc que mostraron propiedades favorables en la exploración anterior. El conjunto completo de variantes de Fc que se construyeron y probaron experimentalmente se muestra en la Tabla 60. En esta tabla, la fila 1 lista las posiciones variables, y las filas que le siguen indican los aminoácidos en esas posiciones variables para TS y las variantes de Fc. Por ejemplo, la variante 18 tiene las cuatro mutaciones siguientes: F241E, F243Y, V262T, y V264R. Los restos de la posición variable que comprenden este conjunto de variantes de Fc se ilustran estructuralmente en la Figura 3, y se presentan en el contexto de la secuencia de Fc de IgG1 humana en la Figura 4.

ES 2 562 177 T3

Tabla 60

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
1												A																			
2												L																			
3												I																			
4					W																										
5					L																										
6						W																									
7						L																									
8					L	L				I		I																			
9					W	W																									
10					W	W				A		A																			
11					L					I																					
12						L						I																			
13						L				I		W																			
14					Y	Y				T		T																			
15					E	R				E		R																			
16					E	Q				T		E																			

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
17					R	Q				T		R																		
18					E	Y				T		R																		
19																									M					
20																									E					
21																									F					
22																												E		
23																									M			E		
24							H																							
25								A																						
26									V																					
27																					F									
28							H	A	V																					
29									G																					
30												I																E		
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
31					E	R				E		R																E		
32					E	Q				T		E																E		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
33					R	Q				T		R																E		
34					E	Y				T		R																E		
35																			A											
36																			A									E		
37																			A										A	A
41			E																									E		
42			Q																									E		
43			E																											
44													G																	
45													N																	
46			E										G																	
47			E										N																	
48			E										Q																	
49																			E											
50																			Q											
51																			T											
52																			N											

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334	
53																				I											
54																								S							
55																								N							
56															Q									S							
57															L									S							
58																								L							
59																										F					
60																												L			
61																												Y			
62																													D		
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K	
62																													D		
63																		S													
64																		D													
65																		S											E		
66																		D											E		
67																		E											E		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334				
68													Y					D										E						
69													Y					D										E						
70													F					E										E						
71																									I			E						
72																									Q			E						
73																												N						
74																												Q						
75													T																					
76													F																					
77				I																														
78													I																					
79																																		
80																																		
81																																		
82																																		
83																																		
84																																		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
85																						I								
86			D																											
87			N																											
88			F																											
89			D																										D	
90			D																										E	
91			D																										N	
92			D																										Q	
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	w	N	K	A	L	P	A	I	E	K
93			E																										D	
94			E																										N	
95			E																										Q	
96			N																										D	
97			N																										E	
98			N																										N	
99			N																										Q	
100			Q																										D	

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
101			Q																									N		
102			Q																									Q		
103																							E							
104																	D													
105																	N													
106				Y	Y				T		T						D											E		
107																											Y	E		
108											I																Y	E		
109																											L	E		
110											I																L	E		
111	D																													
112	E																													
112	N																													
114	Q																													
115	T																													
116	H																													
117	Y																													

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
118	I																													
119	V																													
120	F																													
121		D																												
122		S																												
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
123		N																												
124		Q																												
125		T																												
126		H																												
127		Y																												
128		I																												
129		V																												
130		F																												
131			T																											
132			H																											
133			Y																											

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
134				A																										
135				T																										
136				M																										
137											A																			
138											T																			
139											M																			
140												M																		
141												Y																		
142														A																
143														T																
144														M																
145																H														
146																Y														
147																F														
148																R														
149																	S													
150																	T													

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
151																	L													
152																	I													
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
153																			H											
154																				H										
155																											V			
156																											I			
157																											F			
158																											R			
159																											H			
160																						D								
161																						E								
162																						A								
163																						T								
164																						V								
165																						H								
66																									D			E		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
167																									E			E		
168																									N			E		
169																									Q			E		
170																									V			E		
171																									T			E		
172																									H			E		
173																									I			E		
174																									A					
175																												T		
176																												H		
177																												Y		
178																												A		
179			E									I																E		
180			Q									I																E		
181			E									I															Y	E		
182			E									I							A								Y	E		
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
183			D															D										E		
184			E															D										E		
185			D										V					D										E		
186			D										I					D										E		
187			D										L					D										E		
188			D										F					D										E		
189			D										Y					D										E		
190			D										H					D										E		
191			D										T					D										E		
192												E						D										E		
193																	D	D										E		
194																	E	D										E		
195																	N	D										E		
196																	Q	D										E		
197																	H	D										E		
198																	T	D										E		
199																		D		V								E		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
200																		D	I								E			
201																		D	L								E			
202																		D	F								E			
203																		D	H								E			
204																		D	E								E			
205																		D									Y	E		
206																		D	A								Y	E		
207			D																								Y	E		
208			N																								Y	E		
209			D																								L	E		
210			N																								L	E		
211												I							A									E		
212			D																A									E		
TS	L	L	S	V	F	F	P	P	P	V	V	V	D	V	S	E	Y	N	S	T	W	N	K	A	L	P	A	I	E	K
213			N																A									E		
214			D									I																E		
215			D									I							A									E		

ES 2 562 177 T3

Posición	234	235	239	240	241	243	244	245	247	262	263	264	265	266	267	269	296	297	298	299	313	325	326	327	328	329	330	332	333	334
216			D								I																L	E		

Ejemplo 2: producción y exploración experimental de bibliotecas de Fc

La mayoría de la experimentación en las variantes de Fc se llevó a cabo en el contexto del anticuerpo anticáncer alemtuzumab (Campath®, una marca registrada de Ilex Pharmaceuticals LP). Alemtuzumab se une a un epítipo lineal corto en su antígeno diana CD52 (Hale *et al.*, 1990, *Tissue Antigens* 35: 118-127; Hale, 1995, *Immunotechnology* 1: 175-187). Se ha seleccionado alemtuzumab como plantilla de diseño por ingeniería genética primaria debido a que su eficacia se debe en parte a su capacidad para reclutar células efectoras (Dyere *et al.*, 1989, *Blood* 73: 1431-1439; Friend *et al.*, 1991, *Transplant Proc* 23: 2253-2254; Hale *et al.*, 1998, *Blood* 92: 4581-4590; Glennie *et al.*, 2000, *Immunol Today* 21: 403-410), y por que la producción y el uso de su antígeno en los ensayos de unión es relativamente directa. Para evaluar las variantes de Fc optimizadas de la presente invención en el contexto de otros anticuerpos, se evaluaron variantes de Fc seleccionadas en el anticuerpo anti CD20 rituximab (Rituxan®, una marca registrada de IDEC Pharmaceuticals Corporation), y el anticuerpo anti Her2 trastuzumab (Herceptin®, una marca registrada de Genentech). El uso de alemtuzumab, rituximab y trastuzumab con fines de exploración no pretende restringir la presente invención a cualquier anticuerpo particular.

Se construyeron los genes IgG1 de anticuerpo de cadena ligera (V_L-C_L) y pesada ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) de longitud completa para alemtuzumab, rituximab, y trastuzumab con sitios de restricción terminales convenientes para facilitar la subclonación. Los genes se ligaron en el vector de expresión en mamíferos pcDNA3.1Zeo (Invitrogen). El clon de $V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$ en pcDNA3.1Zeo se usó como molde para la mutagénesis de la región Fc. Se introdujeron mutaciones en este clon usando técnicas de mutagénesis basadas en la PCR. Las variantes de Fc se secuenciaron para confirmar la fidelidad de la secuencia. Se cotransfectaron plásmidos que contenían genes de cadena pesada ($V_H-C\gamma 1-C\gamma 2-C\gamma 3$) (de tipo silvestre o variantes) con plásmido que contenía gen de cadena ligera (V_L-C_L) en células 293T. Se recogieron los medios 5 días después de la transfección. La expresión de inmunoglobulina se controló explorando el sobrenadante de cultivo de los transfectomas mediante transferencia de western usando IgG de cabra anti-humano conjugado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, n.º de catálogo 109-035-088). La Figura 6 muestra la expresión de alemtuzumab de tipo silvestre y las variantes 1 a 10 en células 293T. Los anticuerpos se purificaron del sobrenadante usando cromatografía de afinidad de proteína A (Pierce, n.º de Catálogo 20334). La Figura 7 muestra resultados de la purificación de proteínas para alemtuzumab de TS. Las variantes de Fc de anticuerpo mostraron resultados de expresión y purificación similares a los de TS. Algunas variantes de Fc se desglucosilaron para determinar sus propiedades de solución y funcionales en ausencia de carbohidrato. Para obtener anticuerpos desglucosilados, se incubaron anticuerpos de alemtuzumab purificados con péptido-N-glucosidasa (PNGasa F) a 37 °C durante 24 horas. La Figura 8 presenta un gel de SDS PAGE que confirma la desglucosilación para varias variantes de Fc y de alemtuzumab de TS.

Para confirmar la fidelidad funcional de alemtuzumab producido en estas condiciones, el péptido antigénico CD52, fusionado a GST, se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) con inducción de IPTG. Se ejecutaron las muestras tanto inducidas como no inducidas en un gel de SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de PVDF. Para el análisis de transferencia de western, se usaron bien alemtuzumab de Sotec (concentración final de 2,5 ng/μl) o medio de células 293T transfectadas (concentración de alemtuzumab final de aproximadamente 0,1-0,2 ng/μl) como anticuerpo primario, y se usó IgG de cabra anti-humano conjugada a peroxidasa como anticuerpo secundario. La Figura 9 presenta estos resultados. La capacidad para unirse al antígeno diana confirma la fidelidad estructural y funcional del alemtuzumab expresado. Se anticipa que las variantes de Fc que tienen la misma región variable que alemtuzumab de TS mantendrán una afinidad de unión al antígeno comparable.

Para explorar la unión de Fc/FcγR, se expresaron y purificaron las regiones extracelulares de V158 FcγRIIIa humano, F158 FcγRIIIa humano, FcγRIIb humano, FcγRIIa humano y de FcγRIII de ratón. La Figura 10 presenta un gel de SDS PAGE que muestra los resultados de la expresión y purificación de V158 FcγRIIIa humano. La región extracelular de este receptor se obtuvo mediante PCR a partir de un clon obtenido de la Colección de Genes de Mamíferos (MGC:22630). El receptor se fusionó con glutatión S-Transferasa (GST) para permitir la exploración. Se transfectó FcγRIIIa marcado en células 293T, y 3 días después se recogieron los medios que contenían FcγRIIIa secretado y se purificaron. Para el análisis de western, la membrana se sondó con anticuerpo anti-GST.

La afinidad de unión a FcγRIIIa y a FcγRIIb se midió para todas las variantes de Fc diseñadas usando un ensayo AlphaScreen™ (Ensayo Homogéneo de Proximidad de Luminiscencia Ampliada (ALPHA), PerkinElmer, Wellesley, MA), un ensayo de proximidad de luminiscencia no radiactiva basado en perlas. La excitación láser de una perla donante excita al oxígeno, que está suficientemente próximo a la perla aceptora y genera una cascada de sucesos quimioluminiscentes, dando lugar en última instancia a emisión de fluorescencia a 520-620 nm. El ensayo AlphaScreen™ se aplicó como ensayo competitivo para explorar variantes de Fc. El anticuerpo alemtuzumab de TS se biotiniló mediante métodos convencionales para la unión a perlas donantes de estreptavidina, y se unió FcγR marcado con GST a perlasceptoras de quelato de glutatión. En ausencia de variantes de Fc competidoras, el anticuerpo de TS y FcγR interactúan y producen una señal a 520-620 nm. La adición de variante de Fc no marcada compite con la interacción Fc de TS/FcγR, reduciendo la fluorescencia de manera cuantitativa para permitir la determinación de las afinidades de unión relativas. Se exploraron todas las variantes de Fc respecto de la unión a V158 FcγRIIIa usando el ensayo AlphaScreen™. Las variantes de Fc seleccionadas se exploraron posteriormente respecto de la unión a FcγRIIb, así como a otros FcγR y ligandos de Fc.

La Figura 11 muestra los datos de AlphaScreen™ para la unión a V158 FcγRIIIa humano mediante variantes de Fc

seleccionadas. Los datos de unión se normalizaron a la señal máxima y mínima de luminiscencia proporcionada por los valores iniciales a bajas y altas concentraciones de anticuerpo competidor, respectivamente. Los datos se ajustaron a un modelo de competición de un sitio usando regresión no lineal, y estos ajustes se representan mediante las curvas en la figura. Estos ajustes proporcionan la concentración inhibidora del 50 % (CI50) (es decir, la concentración necesaria para un 50 % de inhibición) para cada anticuerpo, ilustrado mediante las líneas de puntos en la Figura 11, permitiendo de este modo la determinación cuantitativa de las afinidades de unión relativa de las variantes de Fc. En este caso, aletuzumab de TS tiene una CI50 de $(4,63 \times 10^{-9}) \times (2) = 9,2$ nM, mientras que S239D tiene una CI50 de $(3,98 \times 10^{-10}) \times (2) = 0,8$ nM. Por lo tanto aletuzumab S239D se une $9,2$ nM / $0,8$ nM = $11,64$ veces más fuertemente que aletuzumab de TS a V158 FcγRIIIa humano. Se llevaron a cabo cálculos similares para la unión de todas las variantes de Fc a V158 FcγRIIIa humano. Las variantes de Fc seleccionadas también se exploraron respecto de la unión a FcγRIIb humano, y los ejemplos de estos datos de unión de AlphaScreen™ se mostraron en la Figura 12. La Tabla 61 presente al múltiplo de potenciación o múltiplo de reducción en relación al anticuerpo progenitor para la unión de variantes de Fc a V158 FcγRIIIa humano (columna 3) y a FcγRIIb humano (columna 4), según se determina mediante el ensayo AlphaScreen™. Para estos datos, una multiplicidad por encima de 1 indica un potenciamiento de la afinidad de unión, y una multiplicidad por debajo de 1 indica una reducción en la afinidad de unión en relación a Fc de TS. Todos los datos se obtuvieron en el contexto de aletuzumab, excepto para aquellos indicados con un asterisco (*), que se ensayaron en el contexto de trastuzumab.

Tabla 61

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcγRIIIa	Multiplicidad FcγRIIb	Multiplicidad-FcγIIIa-Multiplicidad-FcγIIb
1	V264A	0,53		
2	V264L	0,56		
3	V264I	1,43		
4	F241W	0,29		
5	F241L	0,26		
6	F243W	0,51		
7	F243L	0,51		
8	F241L/F243L/V262I/V264I	0,09		
9	F241W/F243W	0,07		
10	F241W/F243W/V262A/V264A	0,04		
11	F241L/V262I	0,06		
12	F243L/V264I	1,23		
13	F243L/V262I/V264W	0,02		
14	F241Y/F243Y/V262T/V264T	0,05		
15	F241E/F243R/V262E/V264R	0,05		
16	F241E/F243Q/V262T/V264E	0,07		
17	F241R/F243Q/V262T/V264R	0,02		
18	F241E/F243Y/V262T/V264R	0,05		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
19	L328M	0,21		
20	L328E	0,12		
21	L328F	0,24		
22	I332E	6,72	3,93	1,71
23	L328M/I332E	2,60		
24	P244H	0,83		
25	P245A	0,25		
26	P247V	0,53		
27	W313F	0,88		
28	P244H/P245A/P247V	0,93		
29	P247G	0,54		
30	V264I/I332E	12,49	1,57*	7,96
31	F241E/F243R/V262E/V264R/I332E	0,19		
32	F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E			
33	F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E			
34	F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E	0,10		
35	S298A	2,21		
36	S298A/I332E	21,73		
37	S298A/E333A/K334A	2,56		
41	S239E/I332E	5,80	3,49	1,66
42	S239Q/I332E	6,60	4,68	1,41
43	S239E	10,16		
44	D265G	<0,02		
45	D265N	<0,02		
46	S239E/D265G	<0,02		
47	S239E/D265N	0,02		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
48	S239E/D265Q	0,05		
49	Y296E	0,73	1,11	0,66
50	Y296Q	0,52	0,43	1,21
51	S298T	0,94	<0,02	
52	S298N	0,41	<0,02	
53	T299I	<0,02		
54	A327S	0,23	0,39	0,59
55	A327N	0,19	1,15	0,17
56	S267Q/A327S	0,03		
57	S267UA327S	<0,02		
58	A327L	0,05		
59	P329F	<0,02		
60	A330L	0,73	0,38	1,92
61	A330Y	1,64	0,75	2,19
62	I332D	17,80	3,34	5,33
63	N297S	<0,02		
64	N297D	<0,02		
65	N297S/I332E	<0,02		
66	N297D/I332E	0,08	<0,02	
67	N297E/I332E	<0,02		
68	D265Y/N297D/I332E	<0,02		
69	D265Y/N297D/T299L/I332E	<0,02		
70	D265F/N297E/I332E	<0,02		
71	L328I/I332E	7,03		
72	L328Q/I332E	1,54		
73	I332N	0,39		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
74	I332Q	0,37		
75	V264T	2,73		
76	V264F	0,16		
77	V240I	3,25		
78	V263I	0,10		
79	V266I	1,86		
80	T299A	0,03		
81	T299S	0,15		
82	T299V	<0,02		
83	N325Q	<0,02		
84	N325L	<0,02		
85	N325I	<0,02		
86	S239D	11,64	4,47*	2,60
87	S239N	<0,02		
88	S239F	0,22	<0,02	
89	S239D/I332D	14,10		
90	S239D/I332E	56,10	19,71*	2,85
91	S239D/I332N	7,19		
92	S239D/I332Q	9,28		
93	S239E/I332D	9,33		
94	S239E/I332N	11,93		
95	S239E/I332Q	3,80		
96	S239N/I332D	3,08		
97	S239N/I332E	14,21		
98	S239N/I332N	0,43		
99	S239N/I332Q	0,56		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
100	S239Q/I332D	5,05		
101	S239Q/I332N	0,39		
102	S239Q/I332Q	0,59		
103	K326E	3,85		
104	Y296D	0,62		
105	Y296N	0,29		
106	F241Y/F243Y/V262T/V264T7N297D/I332E	0,15		
107	A330Y/I332E	12,02	4,40	2,73
108	V264I/A330Y/I332E	12,00	3,54	3,39
109	A330L/I332E	10,34	2,03	5,09
110	V264I/A330L/I332E	11,15	1,79	6,23
111	L234D	0,21		
112	L234E	1,34	2,21	0,61
113	L234N	0,56	1,39	0,40
114	L234Q	0,37		
115	L234T	0,35		
116	L234H	0,33		
117	L234Y	1,42	1,08	1,31
118	L234I	1,55	1,14	1,36
119	L234V	0,38		
120	L234F	0,30		
121	L235D	1,66	3,63	0,46
122	L235S	1,25		
123	L235N	0,40		
124	L235Q	0,51		
125	L235T	0,52		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
126	L235H	0,41		
127	L235Y	1,19	10,15	0,12
128	L235I	1,10	0,94	1,17
129	L235V	0,48		
130	L235F	0,73	3,53	0,21
131	S239T	1,34		
132	S239H	0,20		
133	S239Y	0,21		
134	V240A	0,70	0,14	5,00
135	V240T			
136	V240M	2,06	1,38	1,49
137	V263A			
138	V263T	0,43		
139	V263M	0,05		
140	V264M	0,26		
141	V264Y	1,02	0,27	3,78
142	V266A	<0,02		
143	V266T	0,45		
144	V266M	0,62		
145	E269H	<0,02		
146	E269Y	0,12		
147	E269F	0,16		
148	E269R	0,05		
149	Y296S	0,12		
150	Y296T	<0,02		
151	Y296L	0,22		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
152	Y296I	0,09		
153	A298H	0,27		
154	T299H	<0,02		
155	A330V	0,43		
156	A330I	1,71	0,02	85,5
157	A330F	0,60		
158	A330R	<0,02		
159	A330H	0,52		
160	N325D	0,41		
161	N325E	<0,02		
162	N325A	0,11		
163	N325T	1,10		
164	N325V	0,48		
165	N325H	0,73		
166	L328D/I332E	1,34		
167	L328E/I332E	0,20		
168	L328N/I332E	<0,02		
169	L328Q/I332E	0,70		
170	L328V/I332E	2,06		
171	L328T/I332E	1,10		
172	L328H/I332E	<0,02		
173	L328I/I332E	3,49		
174	L328A	0,20		
175	I332T	0,72		
176	I332H	0,46		
177	I332Y	0,76		

ES 2 562 177 T3

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcyRIIIa	Multiplicidad FcyRIIb	Multiplicidad-FcyIIIa-Multiplicidad-FcyIIb
178	I332A	0,89		
179	S239E/V264I/I332E	15,46		
180	S239Q/V264I/I332E	2,14		
181	S239E/V264I/A330Y/I332E	8,53		
182	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E			
183	S239D/N297D/I332E	0,28		
184	S239E/N297D/I332E	0,06		
185	S239D/D265V/N297D/I332E			
186	S239D/D265I/N297D/I332E			
187	S239D/D265L/N297D/I332E	<0,02		
188	S239D/D265F/N297D/I332E	<0,02		
189	S239D/D265Y/N297D/I332E	0,02		
190	S239D/D265H/N297D/I332E	0,04		
191	S239D/D265T/N297D/I332E	<0,02		
192	V264I/N297D/I332E	0,05		
193	Y296D/N297D/I332E			
194	Y296E/N297D/I332E	<0,02		
195	Y296N/N297D/I332E	0,04		
196	Y296Q/N297D/I332E	<0,02		
197	Y296H/N297D/I332E	<0,02		
198	Y296T/N297D/I332E	<0,02		
199	N297D/T299V/I332E	<0,02		
200	N297D/T299I/I332E	<0,02		
201	N297D/T299L/I332E	<0,02		
202	N297D/T299F/I332E	<0,02		
203	N297D/T299H/I332E	<0,02		

Variante	Sustitución(es)	Multiplicidad FcγRIIIa	Multiplicidad FcγRIIb	Multiplicidad-FcγIIIa-Multiplicidad-FcγIIb
204	N297D/T299E/I332E	<0,02		
205	N297D/A330Y/I332E	0,43		
206	N297D/S298A/A330Y/I332E			
207*	S239D/A330Y/I332E	129,58		
208*	S239N/A330Y/I332E	14,22		
209*	S239D/A330L/I332E	138,63	7,50	18,48
210*	S239N/A330L/I332E	12,95		
211*	V264I/S298A/I332E	16,50		
212*	S239D/S298A/I332E	295,16	6,16	47,92
213*	S239N/S298A/I332E	32,14	5,15	6,24
214*	S239D/V264I/I332E	36,58	14,39	2,54
215*	S239D/V264I/S298A/I332E			
216*	S239DA/264I/A330L/I332E			

Ejemplo 3: unión potenciada de manera selectiva a FcγR

5 Se obtuvieron una serie de variantes de Fc prometedoras con propiedades optimizadas a partir de la exploración de FcγRIIIa y FcγRIIb. La Tabla 61 proporciona variantes de Fc que se unen con más fuerza a FcγRIIIa, y por lo tanto son candidatos para mejorar la función efectora de anticuerpos y fusiones de Fc. Estos incluyen una serie de variantes que comprenden sustituciones en 239, 264, 330 y 332. La Figura 13 muestra los datos de unión de AlphaScreen™ para algunas de estas variantes de Fc. La mayoría de estas variantes de Fc proporcionan sustancialmente mayores potenciamientos de unión a FcγRIIIa frente a S298A/E333A/K334A.

10 Aunque la mayoría de las variantes de Fc se exploraron en el contexto del anticuerpo alemtuzumab, también se exploraron variantes de Fc seleccionadas en el contexto de rituximab y trastuzumab. Los datos de AlphaScreen™ para la unión de variantes de Fc seleccionadas a V158 FcγRIIIa humano en el contexto de rituximab y trastuzumab se muestran en las Figuras 14 y 15, respectivamente. Los resultados indican que las variantes de Fc muestran potenciamientos de la unión consistentes independientemente del contexto del anticuerpo, y por lo tanto las variantes de Fc de la presente invención son ampliamente aplicables a anticuerpos y fusiones de Fc.

15 Se han obtenido variantes de Fc que muestran una unión potenciada de manera diferencial a FcγRIIIa frente a FcγRIIb. Tal como se ha discutido, la función efectora óptima puede resultar de variantes de Fc en las que la afinidad por FcγR activadores es mayor que la afinidad por los FcγRIIb inhibidores. Los datos de AlphaScreen™ que comparan directamente la unión a FcγRIIIa y FcγRIIb para dos variantes de Fc con este perfil de especificidad se muestran en las Figuras 16a y 16b. Este concepto puede definirse de manera cuantitativa como el múltiplo de potenciación o de reducción del FcγR activante (Tabla 61, columna 3) dividido entre el múltiplo de potenciación o reducción del FcγR inhibidor (Tabla 61, columna 4), en el presente documento citados como la proporción múltiplo de FcγRIIIa:múltiplo de FcγRIIb. Este valor se proporciona en la Columna 5 en la Tabla 61. La Tabla 61 muestra que las variantes de Fc proporcionan este perfil de especificidad, con una proporción múltiplo de FcγRIIIa:múltiplo de FcγRIIb tan alto como 86:1.

25 Algunas de las variantes de Fc más prometedoras de la presente divulgación para potenciar la función efectora tienen tanto aumentos sustanciales en la afinidad por FcγRIIIa como proporciones de múltiplo de FcγRIIIa:múltiplo de FcγRIIb favorables. Estos incluyen, por ejemplo, S239D/I332E (múltiplo de FcγRIIIa = 56, múltiplo de

FcyRIIIa:múltiplo de FcyRIIb = 3), S239D/A330Y/I332E (múltiplo de FcyRIIIa = 130), S239D/A330L/I332E (múltiplo de FcyRIIIa = 139, múltiplo de FcyRIIIa:múltiplo de FcyRIIb = 18), y S239D/S298A/I332E (múltiplo de FcyRIIIa = 295, múltiplo de FcyRIIIa:múltiplo de FcyRIIb = 48). La Figura 17 muestra los datos de unión de AlphaScreen™ para estas y otras variantes de Fc a V158 FcyRIIIa humano.

5 Debido a que hay una serie de FcyR que contribuyen a la función efectora, puede ser útil explorar adicionalmente variantes de Fc contra otros receptores. La Figura 8 muestra datos de AlphaScreen™ para la unión de variantes de Fc seleccionadas a R131 FcyRIIIa humano. Tal como puede observarse, estas variantes anteriormente mencionadas con potenciamentos de unión y perfiles de especificidad favorables también muestran unión potenciada a este receptor activador. El uso de FcyRIIIa, FcyRIIb, y FcyRIIc para la exploración no pretende restringir las pruebas
10 experimentales a estos FcyR particulares; se contemplan para la exploración otros FcyR, incluyendo, sin limitación, las miles de isoformas y alotipos de FcyRI, FcyRII y FcyRIII de humanos, ratones, ratas, monos y similares, tal como se ha descrito anteriormente.

Tomados en conjunto, los datos de unión a FcyR proporcionados en las Figuras 11-18 y en la Tabla 61 indican que una serie de sustituciones en las posiciones 234, 235, 239, 240,243, 264, 266, 325, 328, 330 y 332 son candidatos
15 prometedores para mejorar la función efectora de anticuerpos y fusiones de Fc. Debido a que las combinaciones de algunas de estas asociaciones han dado como resultado típicamente mejoras de la unión aditivas o sinérgicas, se anticipa que combinaciones aún sin explorar de las variantes de Fc proporcionadas en la Tabla 61 también proporcionarán resultados favorables. Por lo tanto, todas las combinaciones de las variantes de Fc en la Tabla 61 están contempladas. Igualmente, las combinaciones de cualquiera de las variantes de Fc en la Tabla 61 con otras
20 variantes de Fc descubiertas o no descubiertas también pueden proporcionar propiedades favorables, y estas combinaciones están contempladas. Además, se anticipa a partir de estos resultados que otras sustituciones en las posiciones 234, 235, 239, 240, 243, 264, 266, 325, 328, 330 y 332 también pueden proporcionar potenciamentos y especificidades de unión favorables, y por lo tanto se contemplan sustituciones en estas posiciones distintas de las presentadas en la Tabla 61.

25 **Ejemplo 4: unión reducida a FcyR**

Tal como se ha discutido, aunque hay una necesidad de mayor función efectora, para algunos agentes terapéuticos de anticuerpos, puede ser deseable una función efectora reducida o eliminada. Varias variantes de Fc en la Tabla 61 reducen sustancialmente o eliminan la unión a FcyR, y por lo tanto pueden ser útiles en anticuerpos y fusiones de Fc en las que no sea deseable la función efectora. Los datos de unión de AlphaScreen™ para algunos ejemplos de
30 dichas variantes se muestran en las Figuras 19a y 19b. Estas variantes de Fc, así como su uso en combinación, pueden ser útiles para eliminar la función efectora cuando se desea, por ejemplo en anticuerpos y fusiones de Fc cuyo mecanismo de acción implique el bloqueo o antagonismo pero no la eliminación de las células que portan el antígeno diana.

Ejemplo 5: variantes de Fc no glucosiladas

35 Tal como se ha discutido, un objetivo de los actuales experimentos era obtener variantes de Fc no glucosiladas optimizadas. Varias variantes de Fc proporcionan un progreso hacia esta meta. Debido a que es el sitio de glucosilación, la sustitución en N297 da como resultado un Fc no glucosilado. Mientras que todas las demás variantes de Fc que comprenden una sustitución N297 suprimen completamente la unión a FcyR, N297D/I332E tiene una afinidad de unión significativa por FcyRIIIa, mostrada en la Tabla 61 e ilustrada en la Figura 20. La razón exacta para este resultado no está clara en ausencia de una estructura de alta resolución para esta variante, aunque las predicciones de exploración computacional sugieren que se debe potencialmente a una combinación de nuevas interacciones favorables Fc/FcyR y a propiedades electrostáticas favorables. De hecho, se prevén otras sustituciones electrostáticas para la posterior optimización de Fc no glucosilado. La Tabla 61 muestra que otras
40 variantes de Fc no glucosiladas tales como S239D/N297D/I332E y N297D/A330Y/I332E proporcionan potenciamentos de unión que proporcionan afinidad para FcyRIIIa entre 0,28 y 0,43 veces respectivamente de alemtuzumab de TS glucosilado. Se contemplan combinaciones de estas variantes con otras variantes de Fc que potencian la unión a FcyR, con el objetivo de obtener variantes de Fc no glucosiladas que se unen a uno o más FcyR con una afinidad que es aproximadamente la misma que o incluso mejor que el Fc progenitor glucosilado. Un conjunto adicional de variantes de Fc prometedoras proporcionan potenciamentos de estabilidad y solubilidad en ausencia de carbohidrato. Las variantes de Fc que comprenden sustituciones en las posiciones 241, 243, 262 y 264,
50 posiciones que no median la unión a FyR, pero que determinan la interfaz entre el carbohidrato y Fc, suprimen la unión a FyR presumiblemente debido a que alteran la conformación del carbohidrato. En la forma desglucosilada, sin embargo, las variantes de Fc F241E/F243R7V262EW264R, F241E/F243QA/262TW264E, F241R/F243QA/262TA/264R y F241E/F243Y/V262TA/264R muestran una unión más fuerte a FcyRIIIa que en forma glucosilada, tal como se muestra por los datos de AlphaScreen™ en la Figura 21. Este resultado indica que estas son posiciones clave para la optimización de la estructura, la estabilidad, la solubilidad y la función de Fc no glucosilado. En su conjunto, estos resultados sugieren que el diseño por ingeniería genética de la proteína puede usarse para restaurar las propiedades funcionales y de solución favorables de los anticuerpos y fusiones de Fc en ausencia de carbohidrato, y marcan el camino para anticuerpos y fusiones de Fc no glucosilados con propiedades de
60 solución favorables y completa funcionalidad que comprendan sustituciones en estas y otras posiciones de Fc.

Ejemplo 6. Afinidad de variantes de Fc por formas polimórficas de FcγRIIIa

Tal como se ha discutido anteriormente, un parámetro importante de la función efectora mediada por Fc es la afinidad de Fc por las formas polimórficas V158 y F158 de FcγRIIIa. Los datos de AlphaScreen™ que comparan la unión de variantes seleccionadas a los dos alotipos del receptor se muestran en la Figura 22a (V158 FcγRIIIa) y la Figura 22b (F158 FcγRIIIa). Tal como puede observarse, todas las variantes mejoran la unión a ambos alotipos de FcγRIIIa. Estos datos indican que aquellas variantes de Fc de la presente divulgación con función efectora potenciada serán ampliamente aplicables a la población entera de pacientes, y que el potenciamiento de la eficacia clínica será potencialmente mayor para la población de pacientes con baja respuesta que más lo necesitan.

Las afinidades de unión a FcγR de estas variantes de Fc se investigaron adicionalmente usando Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) (Biacore, Uppsala, Suecia). SPR es un método sensible y extremadamente cuantitativo que permite medir las afinidades de unión de interacciones proteína-proteína, y se ha usado para medir de manera eficaz la unión de Fc/FcγR (Radaev *et al.*, 2001, *J Biol Chem* 276: 16478-16483). Por lo tanto, SPR proporciona un excelente ensayo de unión complementario al ensayo AlphaScreen™. Se inmovilizó V158 FcγRIIIa etiquetado con His a una placa de SPR, se hicieron fluir anticuerpos de alemtuzumab de TS y variantes de Fc sobre el chip a un intervalo de concentraciones. Las constantes de unión se obtuvieron ajustando los datos usando métodos de ajuste de curvas convencionales. La Tabla 62 representa las constantes de disociación (K_d) para la unión de variantes de Fc seleccionadas a V158 FcγRIIIa y a F158 FcγRIIIa obtenidas usando SPR, y compara estas con las CI50 obtenidas del ensayo AlphaScreen™. Al dividir la K_d y la CI50 para cada variante entre las de alemtuzumab de TS, se obtiene el múltiplo de mejora frente a TS (Múltiplo).

Tabla 62

	SPR V158 FcγRIIIa		SPR F158 FcγRIIIa		AlphaScreen™ V158 FcγRIIIa		AlphaScreen™ F158 FcγRIIIa	
	K _d (nM)	Fold	K _d (nM)	Fold	IC50 (nM)	Fold	IC50 (nM)	Fold
TS	68		730		6,4		17,2	
V264I	64	1,1	550	1,3	4,5	1,4	11,5	1,5
I332E	31	2,2	72	10,1	1,0	6,4	2,5	6,9
V264I/I332E	17	4,0	52	14,0	0,5	12,8	1,1	15,6
S298A	52	1,3	285	2,6	2,9	2,2	12,0	1,4
S298A/E333A/K334A	39	1,7	156	4,7	2,5	2,6	7,5	2,3

Los datos de SPR corroboran las mejoras en la afinidad de FcγRIIIa observados mediante el ensayo AlphaScreen™. La Tabla 62 indica además la superioridad de V264I/I332E e I332E sobre S298A y S298A/E333A/K334A; mientras que S298A/E333A/K334A mejora la unión de Fc a V158 y F158 FcγRIIIa en 1,7 veces y 4,7 respectivamente, I332E muestra potenciamientos de la unión de 2,2 veces y 10,1 veces respectivamente y V264I/I332E muestra potenciamientos de la unión 4,0 veces y 14 veces respectivamente. También cabe destacar que la afinidad de V264I/I332E por F158 FcγRIIIa (52 nM) es mejor que la de TS para el alotipo V158 (68 nM), lo que sugiere que esta variante de Fc, así como aquellas con mejoras de la unión incluso mayores, pueden permitir una eficacia clínica de los anticuerpos para la población de pacientes con poca respuesta que la actualmente posible para los que tienen alta respuesta. La correlación entre las mediciones de unión de SPR y AlphaScreen™ se muestran en las Figuras 23a-23d. Las Figuras 23a y 23b muestran las correlaciones K_d - CI50 para la unión a V158 FcγRIIIa y F158 FcγRIIIa respectivamente, y las Figuras 23c y 23d muestran las correlaciones de múltiplo de mejora para la unión a V158 FcγRIIIa y F158 FcγRIIIa respectivamente. Los buenos ajustes de estos datos a líneas rectas ($r^2 = 0,9$, $r^2 = 0,84$, $r^2 = 0,98$ y $r^2 = 0,90$) apoyan la precisión de las mediciones de AlphaScreen™, y validan su uso para determinar las afinidades de unión relativas a FcγR de las variantes de Fc.

Ejemplo 7. ADCC de variantes de Fc

Para determinar el efecto en la función efectora, se llevaron a cabo ensayos de ADCC basados en células en variante de Fc seleccionadas. La ADCC se midió usando el ensayo de citotoxicidad basado en EuTDA DELFIA® (Perkin Elmer, MA) con monocitos de sangre periférica humanos purificados (CMSP) como células efectoras. Las células diana se cargaron con BATDA a 1×10^6 células/ml, se lavaron 4 veces y se sembraron en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo. Las células diana se osonizaron usando variante de Fc o anticuerpos de TS a la concentración final indicada. Se añadieron CMSP humanos al exceso múltiplo de células diana indicados y se incubó la placa a 37 °C durante 4 horas. Las células cultivadas conjuntamente se centrifugaron a 500 g, los sobrenadantes se transfirieron a una placa separada y se incubaron con solución de Eu, y se midieron las unidades de fluorescencia relativas usando un lector Packard Fusión™ (Packard Biosciences, IL). Las muestras se ejecutaron en triplicado para proporcionar estimaciones de error (n=3, +/- D.E.). Se alotiparon los CMSP respecto del alotipo V158 o F158 de FcγRIIIa usando PCR.

Los ensayos de ADCC se ejecutaron en alemtuzumab variante de Fc y de TS usando células diana de linfoma DoHH-2. La Figura 24a es un diagrama de barras que muestra la ADCC de estas proteínas a 10 ng/ml de anticuerpo. Los resultados muestran que las variantes de Fc I332E, V264I e I332EA/264I de alemtuzumab tienen una ADCC sustancialmente potenciada en comparación con alemtuzumab de TS, siendo las potenciaciones de ADCC relativas proporcionales a sus mejoras de unión a FcγRIIIa tal como se indica por los ensayos AlphaScreen™ y SPR. La dependencia de la dosis de la ADCC en la concentración de anticuerpos se muestra en la Figura 24b. Estos datos se normalizaron a la señal de fluorescencia mínima y máxima proporcionada por los valores iniciales a altas y bajas concentraciones de anticuerpo, respectivamente. Estos datos se ajustaron a un modelo de dosis-respuesta sigmoidal usando regresión no lineal, representados por la curva en la figura. Los ajustes permiten la determinación de la concentración eficaz del 50 % (CE50) (es decir la concentración necesaria para una eficacia del 50 %), que proporciona las potenciaciones relativas de la ADCC para cada variante de Fc. Las CE50 para estos datos de unión son análogos a las CI50 obtenidas de los datos de competición de AlphaScreen™, y la derivación de estos valores es por lo tanto análoga a la descrita en el Ejemplo 2 y la Figura 11. En la Figura 24b, las log(CE50), obtenidas a partir de los ajustes a los datos, para TS, V264I/I332E y S239D/I332E de alemtuzumab son 0,99, 0,60 y 0,49 respectivamente, y por lo tanto sus CE50 respectivas son 9,9, 4,0 y 3,0. Por lo tanto, V264I/I332E y S239E/I332E proporcionan una potenciación de 2,5 veces y 3,3 veces respectivamente en la ADCC frente a alemtuzumab de TS usando CMSP que expresan V158/F158 FcγRIIIa heterocigótico. Estos datos se resumen en la Tabla 63 a continuación.

Tabla 63

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	Mejora de multiplicidad frente a TS
TS	0,99	9,9	
V264I/I332E	0,60	4,0	2,5
S239D/I332E	0,49	3,0	3,3

Para determinar si estas potenciaciones de ADCC son ampliamente aplicables a anticuerpos, se evaluaron variantes de Fc seleccionadas en el contexto de rituximab y trastuzumab. Se ejecutaron ensayos de ADCC en V264I/I332E, TS y S298A/D333A/K334A rituximab usando células diana de linfoma WIL2-S. La Figura 25a presenta un diagrama de barras que muestra la ADCC de estas proteínas a 1 ng/ml de anticuerpo. Los resultados indican que V264I/I332E rituximab proporciona una ADCC sustancialmente potenciada en relación a rituximab de TS, así como una ADCC superior a S298A/D333A/K334A, lo que es coherente con las mejoras de unión de FcγRIIIa observadas mediante los ensayos AlphaScreen™ y SPR. La Figura 25b muestra la dependencia de la dosis de la ADCC en la concentración de anticuerpo. Las CE50 obtenidas a partir de los ajustes de estos datos y las mejoras múltiplo relativas en la ADCC se proporcionan en la Tabla 64 a continuación. Tal como puede observarse, V264I/I332E rituximab proporciona una potenciación de 11,3 veces en la CE50 frente a TS para CMSP que expresan F158/F158 FcγRIIIa homocigótico. Las mayores mejoras observadas para rituximab frente a alemtuzumab se deben probablemente al uso de CMSP con F158/F158 FcγRIIIa homocigóticos en lugar de V158/F158 FcγRIIIa heterocigóticos, así como potencialmente al uso de diferentes anticuerpos y líneas celulares diana.

Tabla 64

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	Mejora de multiplicidad frente a TS
TS	0,23	1,7	
S298A/E333A/K334A	-0,44	0,37	4,6
V264I/I332E	-0,83	0,15	11,3

5 Se llevaron a cabo ensayos de ADCC en variantes de trastuzumab de Fc variante y de TS usando dos líneas celulares diana de carcinoma de mama BT474 y Sk-Br-3. La Figura 26a muestra un diagrama de barras que ilustra la ADCC a 1 ng/ml de anticuerpo. Los resultados indican que V264I y V264I/I332E trastuzumab proporcionan una ADCC sustancialmente potenciada en comparación con trastuzumab de TS, siendo los potenciamientos de ADCC relativos proporcionales a sus mejoras de unión a FcγRIIIa, tal como se indica mediante los ensayos AlphaScreen™ y SPR. LA Figura 26b muestra la dependencia de la dosis de la ADCC en la concentración de anticuerpo. La CE50 obtenida a partir de los ajustes de estos datos y el múltiplo de mejora relativa en la ADCC se proporciona en la Tabla 65 a continuación. Se observaron mejoras en la ADCC significativas para I332E trastuzumab en combinación cuando se combinaron con A330Y.

Tabla 65

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	Mejora de multiplicidad frente a TS
TS	0,23	1,7	
S298A/E333A/K334A	-0,44	0,37	4,6
V264I/I332E	-0,83	0,15	11,3

15 La Figura 26c muestra otro conjunto de datos de ADCC de respuesta a la dosis a concentraciones de anticuerpo variables para variantes de trastuzumab. Las CE50 obtenidas a partir de los ajustes de estos datos y las mejoras múltiplo relativas en la ADCC se proporcionan en la Tabla 66 a continuación. Los resultados muestran que las variantes de Fc de trastuzumab S239D/I332E, S239D/S298A/I332E, S239D/A330Y/I332E y S239D/A330L/I332E/ proporcionan potenciamientos de ADCC sustanciales en relación a trastuzumab de TS y S298A/E333A/K334A; lo que es coherente con los datos de unión a FcγR observados mediante los ensayos AlphaScreen™ y SPR. S239D/A330L/I332E trastuzumab muestra el mayor aumento de la función efectora observada hasta ahora, proporcionando una potenciación de aproximadamente 50 veces en la CE50 frente a TS para CMSP que expresan F158/F158 FcγRIIIa homocigótico.

Tabla 66

	log(EC50)	EC50 (ng/ml)	Mejora de multiplicidad frente a TS
TS	0,45	2,83	
S298A/E333A/K334A	-0,17	0,67	4,2
S239D/I332E	-0,18	0,66	4,3
S239D/A330Y/I332E	-0,29	0,51	5,5
S239D/S298A/I332E	-0,52	0,30	9,4
S239D/A330L/I332E	-1,22	0,06	47,2

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

La proteína de complemento C1q se une a un sitio en Fc que está próximo al sitio de unión a FcγR, y por lo tanto fue prudente determinar si las variantes de Fc han mantenido su capacidad para reclutar y activar al complemento. Se usó el ensayo AlphaScreen™ para medir la unión de variantes de Fc seleccionadas a la proteína del complemento C1q. El ensayo se llevó a cabo con anticuerpo alemtuzumab de TS biotinilado unido a perlas donantes de estreptavidina tal como se describe en el Ejemplo 2, y usando C1q acoplado directamente a perlasceptoras. Los datos de unión de las variantes de Fc seleccionados mostrados en la Figura 27a indican que la unión a C1q no está comprometida. Se llevaron a cabo también ensayos de CDC basados en células en variantes de Fc seleccionadas para investigar si las variantes de Fc mantienen la capacidad para activar al complemento. Se usó Alamar Blue para controlar la lisis de células de linfoma WIL2-S opsonizadas con variante de Fc y rituximab de TS por el complemento sérico humano (Quidel, San Diego, CA). Los resultados mostrados en la Figura 27b para las variantes de Fc seleccionadas indican que la CDC no está comprometida.

Ejemplo 9. Unión a proteína A de variantes de Fc

Tal como se ha discutido, la proteína A bacteriana se une a la región Fc entre los dominios Cγ2 y Cγ3, y se emplea frecuentemente para la purificación de anticuerpos. Se usó el ensayo AlphaScreen™ para medir la unión de variantes de Fc seleccionadas a proteína A usando anticuerpos alemtuzumab de TS biotinilados unidos a perlas donantes de estreptavidina tal como se describe en el Ejemplo 2, y usando proteína A acoplada directamente a perlasceptoras. Los datos de unión mostrados en la Figura 28 para variantes de Fc seleccionadas indican que la capacidad de las variantes de Fc de unirse a proteína A no se ve comprometida. Estos resultados sugieren que la afinidad de las variantes de Fc por otros ligandos de Fc que se unen al mismo sitio en Fc que la proteína A, tales como el receptor de Fc neonatal FcRn y la proteína G, tampoco se ven afectados.

Ejemplo 10. Capacidad de las variantes de Fc para unirse a FcγR de ratón

La optimización de Fc para FcγR no humanos puede ser útil para probar experimentalmente variantes de Fc en modelos animales. Por ejemplo, cuando se ensaya en ratones (por ejemplo ratones desnudos, ratones SCID, ratones xenoinjertados, y/o ratones transgénicos), los anticuerpos y las fusiones de Fc que comprenden variantes de Fc que están optimizadas para uno o más FcγR de ratón pueden proporcionar información valiosa respecto de la eficacia, mecanismo de acción y similares. Para evaluar si las variantes de Fc de la presente invención pueden ser útiles en dichos experimentos, se midió la afinidad de variantes de Fc seleccionadas a FcγRIII de ratón usando el ensayo AlphaScreen™. El ensayo AlphaScreen™ se llevó a cabo usando alemtuzumab de TS biotinilado unido a perlas donantes de estreptavidina tal como se describe en el Ejemplo 2, y FcγRIII de ratón etiquetado con GST unido a perlasceptoras de quelato de glutatión, expresado y purificado tal como se describe en el Ejemplo 2. Estos datos de unión se muestran en la Figura 29. Los resultados muestran que algunas variantes de Fc que potencian la unión a FcγRIIIa humano también potencian la unión a FcγRIIIa de ratón. Este resultado indica que las variantes de Fc de la presente invención, u otras variantes de Fc que estén optimizadas para FcγR no humanos, pueden ser útiles en experimentos que usan modelos animales.

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

Mientras que las variantes de Fc de la presente invención se expresaron en células 293T con fines de exploración, la producción a gran escala de anticuerpos se lleva a cabo típicamente mediante expresión en líneas celulares de Ovario de Hámster Chino (CHO). Para evaluar las propiedades de las variantes de Fc expresadas en CHO, se expresaron variantes de Fc y de alemtuzumab de TS seleccionados en células CHO y se purificaron tal como se describe en el Ejemplo 2. La Figura 30 muestra los datos de AlphaScreen™ que comparan la unión de variante de Fc expresada en CHO y en 293T y alemtuzumab de TS a V158 FcγRIIIa humano. Los resultados indican que las variantes de Fc de la presente invención muestran potenciamientos de la unión a FcγR comparables ya se expresen en 293T o en CHO.

Ejemplo 12. Aplicación terapéutica de variantes de Fc

Una serie de variantes de Fc descritas en la presente divulgación tienen un potencial significativo para mejorar la eficacia terapéutica de los anticuerpos anti cáncer. Con fines ilustrativos, se han incorporado una serie de variantes de Fc de la presente invención en la secuencia del anticuerpo rituximab. La cadena ligera y la cadena pesada de rituximab de TS, descritas en el documento US 5.736.137, se proporcionan en las Figuras 31a y 32b. Las secuencias de anticuerpo anti CD20 mejoradas se proporcionan en la Figura 31c. Las secuencias de anticuerpo anti CD20 mejoradas comprenden al menos un aminoácido no de TS seleccionado entre el grupo que consiste en X₁ X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆. Estas secuencias de anticuerpo anti CD20 mejoradas también pueden comprender una sustitución Z₁. El uso de rituximab en este caso es solamente un ejemplo y no pretende restringir la aplicación de las variantes de Fc a este anticuerpo o a cualquier otro anticuerpo o fusión de Fc particular.

Mientras que las realizaciones particulares de la invención se han descrito anteriormente con fines de ilustración, se apreciará por los expertos en la materia que pueden efectuarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la invención tal como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

La divulgación incluye además la materia objeto de las reivindicaciones del documento EP 08020666.7 del que procede esta solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como párrafos numerados.

- 5 Párrafo 1. Un polipéptido variante que comprende una región Fc, comprendiendo dicho polipéptido una modificación de aminoácidos en la posición 332 en comparación con un polipéptido progenitor, en el que la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat.
- 10 Párrafo 2. Un polipéptido de acuerdo con el párrafo 1, en el que dicho polipéptido variante tiene una propiedad alterada en comparación con dicho polipéptido progenitor, seleccionándose dicha propiedad entre el grupo que consiste en unión a un FcyR y función efectora.
- 15 Párrafo 3. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 1, en el que dicho polipéptido variante comprende las modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en 264I/332E, 241 E/243R/262E/264R/332E, 241E/243Q/262T/264E/332E, 241R/243Q/262T/264R/332E, 241E/243Y/262T/264R/332E, 298A/332E, 239E/332E, 239Q/332E, 297S/332E, 297D/332E, 297E/332E, 265Y/297D/332E, 265Y/297D/299U/332E, 265F/297E/332E, 328I/332E, 328Q/332E, 239D/332D, 239D/332E, 239D/332N, 239D/332Q, 239E/332D, 239E/332N, 239E/332Q, 239N/332D, 239N/332E, 239N/332N, 239N/332Q, 239Q/332D, 239Q/332N, 239Q/332Q, 241 Y/243Y/262T/264T/297D/332E, 330Y/332E, 264I/330Y/332E, 330U/332E, 264I/330L/332E, 328D/332E, 328E/332E, 328N/332E, 328Q/332E, 328V/332E, 328T/332E, 328H/332E, 328I/332E, 239E/264I/332E, 239Q/264I/332E, 239E/264I/330Y/332E, 239E/264I/298A/330Y/332E, 239D/297D/332E, 239E/297D/332E, 239D/265V/297D/332E, 239D/265I/297D/332E, 239D/265U/297D/332E, 239D/265F/297D/332E, 239D/265Y/297D/332E, 239D/265H/297D/332E, 239D/265T/297D/332E, 264E/297D/332E, 296D/297D/332E, 296E/297D/332E, 296N/297D/332E, 296Q/297D/332E, 296H/297D/332E, 296T/297D/332E, 297D/299V/332E, 297D/299I/332E, 297D/299U/332E, 297D/299F/332E, 297D/299H/332E, 297D/299E/332E, 297D/330Y/332E, 297D/298A/330Y/332E, 239D/330Y/332E, 239N/330Y/332E, 239D/330U/332E, 239N/330L/332E, 264I/298A/332E, 239D/298A/332E, 239N/298A/332E, 239D/264I/332E, 239D/264I/298A/332E y 239D/264I/330L/332E.
- 25 Párrafo 4. Un polipéptido variante de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos precedentes, en el que dicho polipéptido variante comprende además al menos una modificación de aminoácido en una posición seleccionada entre el grupo que consiste en: 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329 y 330.
- 30 Párrafo 5. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en el que dicha modulación es un aumento en la afinidad de dicho polipéptido por dicho FcyR.
- 35 Párrafo 6. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 5, en el que dicho polipéptido progenitor es humano, y dicha afinidad es aproximadamente 5 veces mayor que la de dicho polipéptido progenitor.
- 40 Párrafo 7. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en el que dicho FcyR es FcyRIIIa seleccionado entre el alotipo V158 o F158 de FcyRIIIa.
- 45 Párrafo 8. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 1, en el que dicha modificación de aminoácido en la posición 332 es D o E.
- 50 Párrafo 9. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes en el que la CDC no está afectada.
- 55 Párrafo 10. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en el que dicha modificación de la región Fc tiene una relación de múltiplo FcyRIIIa:múltiplo FcyRIIb mayor de 1.
- 60 Párrafo 11. Un polipéptido variante de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 3, en el que dicha modificación en la región Fc se une a al menos un FcyR con afinidad reducida en relación al polipéptido progenitor.
- 65 Párrafo 11. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 10, en el que dicho FcyR es FcyRIIIa.
- 70 Párrafo 12. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1 a 3, en el que dicha función efectora es ADCC.
- 75 Párrafo 13. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 12, en el que dicho Fc variante reduce la ADCC en comparación con dicho polipéptido progenitor.
- 80 Párrafo 14. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes, en el que dicho polipéptido comprende además una glucoforma modificada por ingeniería genética.
- 85 Párrafo 15. Un polipéptido variante que comprende una modificación de aminoácidos de región de Fc no glucosilada de un polipéptido progenitor que comprende una modificación de aminoácidos en la región Fc de dicho polipéptido progenitor en la posición 332, en el que dicha modificación de aminoácido región Fc no glucosilada tiene estabilidad, solubilidad o afinidad de unión mejorada a un FcyR en relación a la forma no glucosilada de dicho polipéptido progenitor.

Párrafo 16. Un polipéptido variante de acuerdo con el párrafo 15, en el que dicha modificación de aminoácido de de región Fc no glucosilada tiene una afinidad de unión mejorada a un FcγR en comparación con la forma no glucosilada del polipéptido progenitor.

5 Párrafo 17. Un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes que comprende un anticuerpo o una función de Fc que comprende dicha modificación de aminoácido de región Fc.

Párrafo 18. Un polipéptido variante de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17 para su uso en terapia.

Párrafo 19. Un polipéptido variante de uno cualquiera de los párrafos 1 a 17, en el que dicho polipéptido variante es un anticuerpo.

10 Párrafo 20. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido variante de acuerdo con cualquiera de los párrafos precedentes y un transportador farmacéuticamente aceptable.

Párrafo 21. Uso de un polipéptido variante de uno cualquiera de los párrafos 1 a 19 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno relacionado con polipéptidos.

15 Párrafo 22. El uso del párrafo 21, en el que el trastorno relacionado con polipéptidos se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inmunológica, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurológica, una enfermedad oncológica y una enfermedad neoplásica.

Listado de secuencias

<110> XENCOR, INC. Lazar, Gregory Alan chirino, Arthur J. Dang, Wei Desjarlais, John Rudolph Doberstein, Stephen Kohl Hayes, Robert J. Karki, Sher Bahadur Vafa,omid

5 <120> VARIANTES DE FC OPTIMIZADAS Y MÉTODOS PARA SU GENERACIÓN

<130> FP-71386-7-PC

10 <140> PCT/US 03/30249
<141> 26-09-2003

<150> US 60/477,839
<151> 12-06-2003

15 <150> US 60/467,606
<151> 02-05-2003

20 <150> US 60/414,433
<151> 27-09-2002

<150> US 60/442,301
<151> 23-01-2003

25 <160> 6

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

30 <211> 451
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Ser Val Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
65 70 75 80

Phe Ser Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Glu Gly His Thr Ala Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

ES 2 562 177 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 562 177 T3

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

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

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

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

Pro Gly Lys
450

<210> 2

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

5

10

ES 2 562 177 T3

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> 3

<211> 213

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

ES 2 562 177 T3

<210> 4
 <211> 451
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

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

ES 2 562 177 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
 450

<210> 5

<211> 451

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

10

<220>

<221> característica_misc

<222> (243)..(243)

<223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: serina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina o treonina

15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (244)..(244)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: valine, isoleucine or methionine
 5

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (268)..(268)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: valina, isoleucina, treonina o tirosina
 10

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (301)..(301)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: asparagina o ácido aspártico
 15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (302)..(302)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: serina o alanina
 20

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (334)..(334)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: alanina, tirosina, leucina o isoleucina
 25

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (336)..(336)
 <223> Xaa puede ser uno de los aminoácidos siguientes: isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina o glutamina
 30

<400> 5

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

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

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

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

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

35

ES 2 562 177 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Xaa Xaa Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que comprende una variante de Fc de un polipéptido de Fc de IgG, en la que dicha variante de Fc tiene una identidad de al menos aproximadamente 80 % con una secuencia de Fc de IgG como se define en la figura 5, en la que dicha variante de Fc comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 328 y en la que la numeración es conforme a la del índice de EU.
2. La proteína de la reivindicación 1, en la que dicha sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en 328A, 328D, 328E, 328F, 328H, 328I, 328M, 328N, 328Q, 328T y 328V.
3. La proteína de la reivindicación 1, en la que dicha sustitución de aminoácidos es 328F.
4. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha proteína es una fusión de Fc.
- 10 5. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que dicha proteína es un anticuerpo.
6. La proteína de la reivindicación 5, en la que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo monoclonal.
7. La proteína de la reivindicación 5 o 6, en la que dicho anticuerpo comprende una glucoforma modificada por ingeniería genética.
- 15 8. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que dicha proteína tiene especificidad por un antígeno diana seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD40, CD40L, CD52, Her2/neu, EGFR, EpCAM, MUC1, GD3, CEA, CA 125, IgE, HLA-DR, TNFalfa, MUC18, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA) y VEGF.
- 20 9. La proteína de la reivindicación 3, en la que dicha proteína es una fusión de Fc o un anticuerpo con especificidad por un antígeno diana seleccionado de CD19 e IgE.
10. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende adicionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.
11. Un ácido nucleico que codifica la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
12. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
- 25 13. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
14. El uso de una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 4-9 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno sensible a anticuerpos, en el que dicho trastorno se selecciona de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inmunológica, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurológica y una enfermedad oncológica o neoplásica.
- 30 15. La proteína de cualquiera de las reivindicaciones 4-9 para su uso en el tratamiento de un trastorno sensible a anticuerpos, en el que dicho trastorno se selecciona de una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inmunológica, una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad neurológica y una enfermedad oncológica o neoplásica.
- 35 16. La proteína de la reivindicación 1, en la que dicha variante de Fc tiene una identidad de al menos aproximadamente 90 % con una secuencia de Fc de IgG como se define en la figura 5.
17. La proteína de la reivindicación 16, en la que dicha variante de Fc tiene una identidad de al menos aproximadamente 95 % con una secuencia de Fc de IgG como se define en la figura 5.

Figura 1

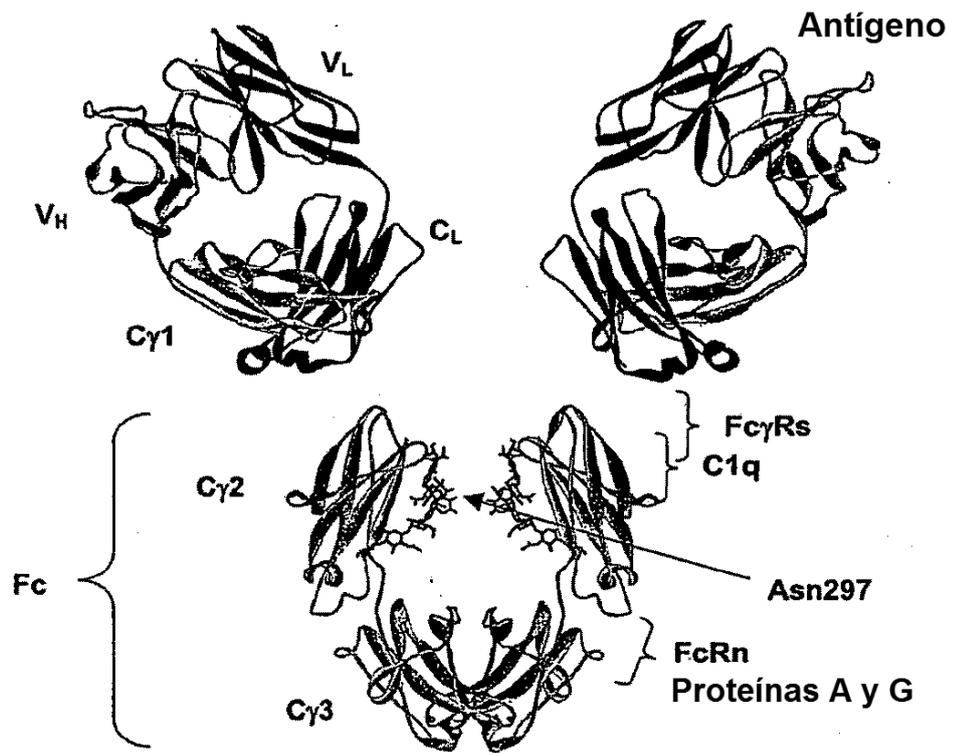


Figura 2

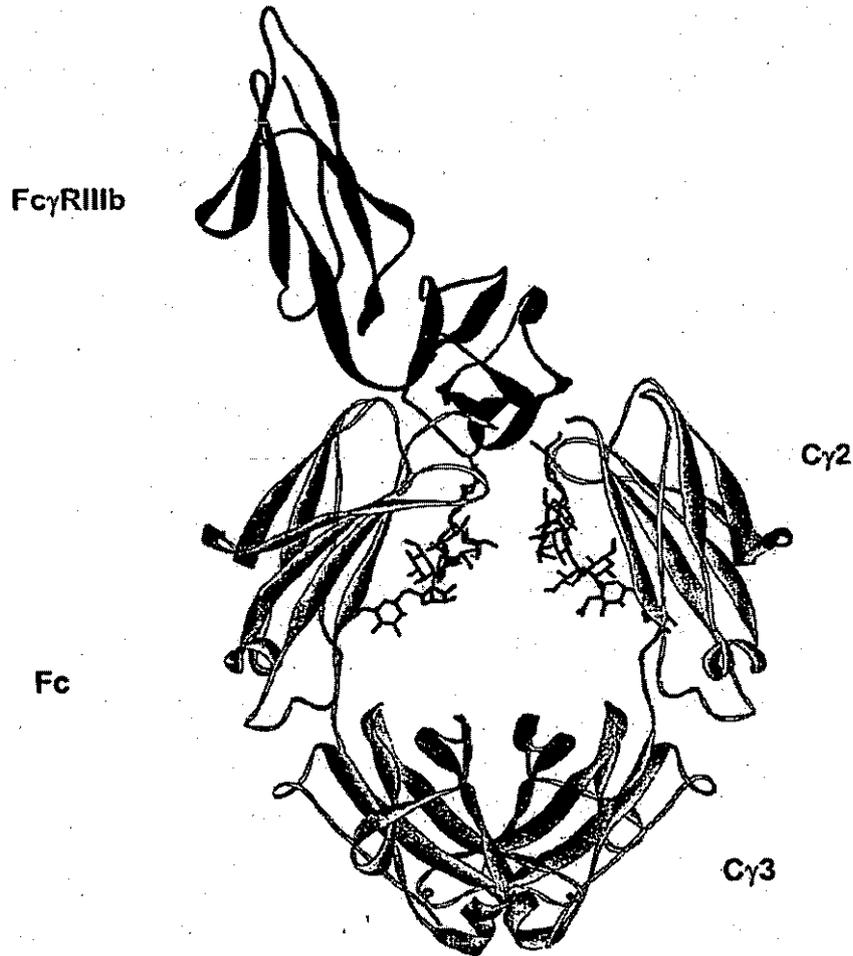


Figura 3

VH1->

1 10 20 30 40 50 60
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 QVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFTFTDFYMNWVRQPPGRGLEWIGFIRDKAKGYTT

70 80 90 100 110 120
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 EYNPSVKGRVTMLVDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCAREGHTAAPFDYWGQSLVTVS

Cy1->

130 140 150 160 170 180
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 SASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

BISAGRA->

190 200 210 220 230 240
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPAPPELLG
 1234567890123456
 KABAT 22 23

Cy2->

250 260 270 280 290 300
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
 240 250 260 270 280 290

?Cy37->

310 320 330 340 350 360
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 NSTYRVVSVLTVHLHQLDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
 789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
 300 310 320 330 340 350

370 380 390 400 410 420
 123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
 ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456
 360 370 380 390 400 410

430 440 450
 12345678901234567890123456789012345678901
 WQQGNVFPSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 7890123456789012345678901234567
 420 430 440

Figura 4

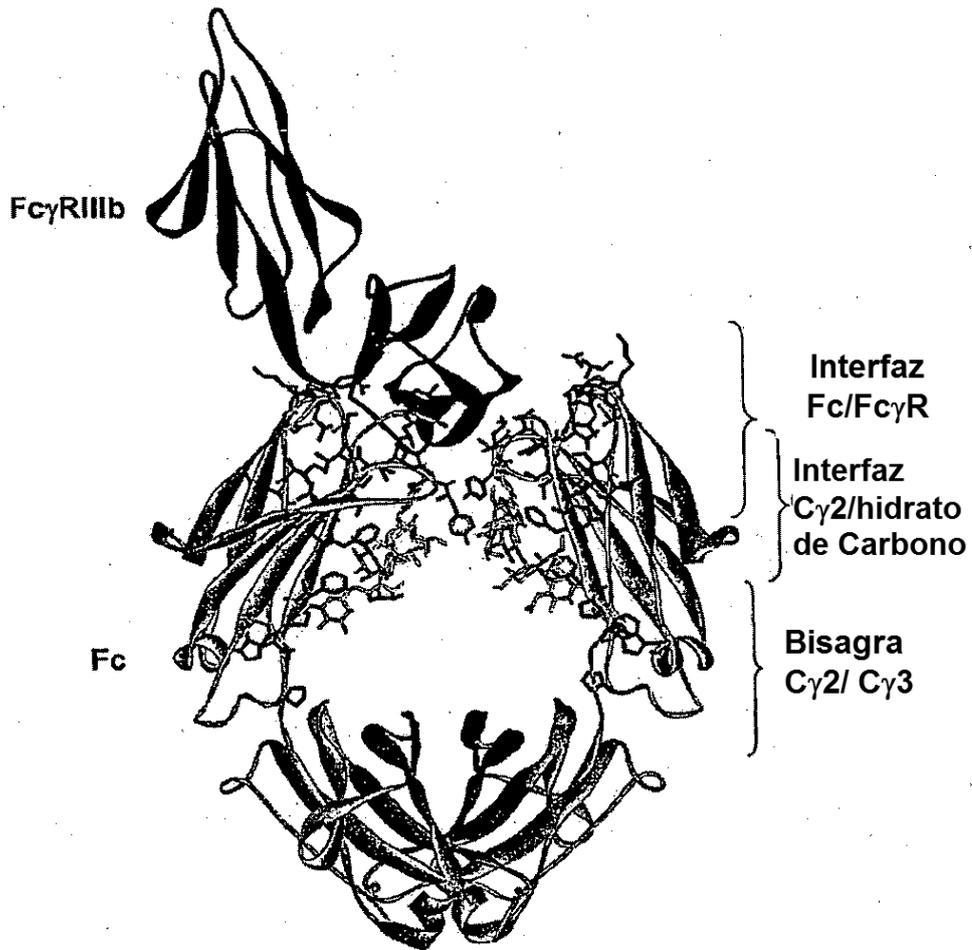


Figura 5

22 23 24 25 26 27 28
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

 29 30 31 32 33 34
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

 35 36 37 38 39 40
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

 41 42 43 44
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK

Figura 6

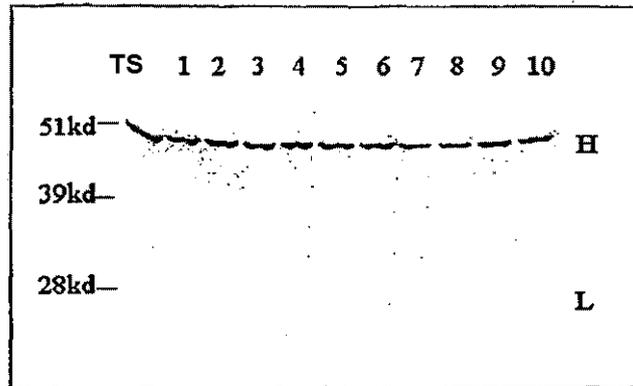


Figura 7

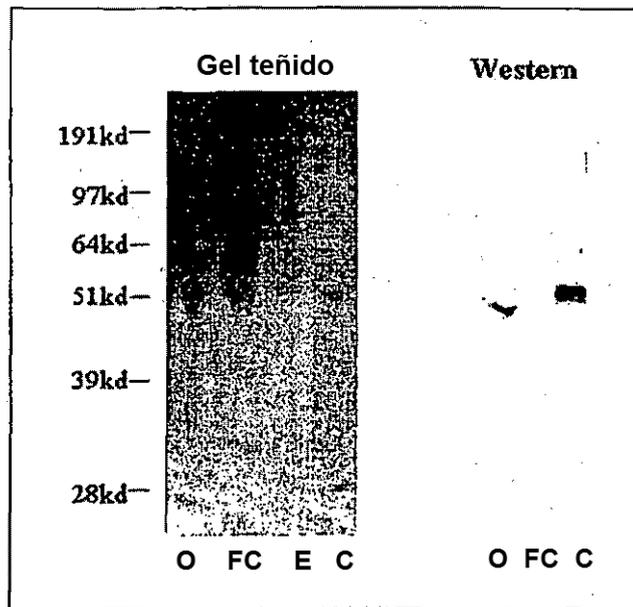


Figura 8

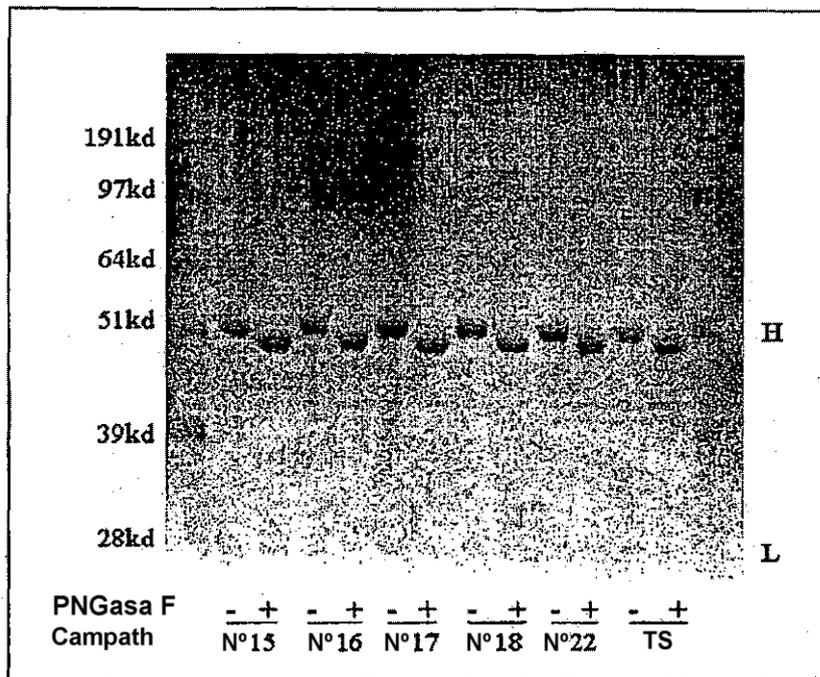


Figura 9

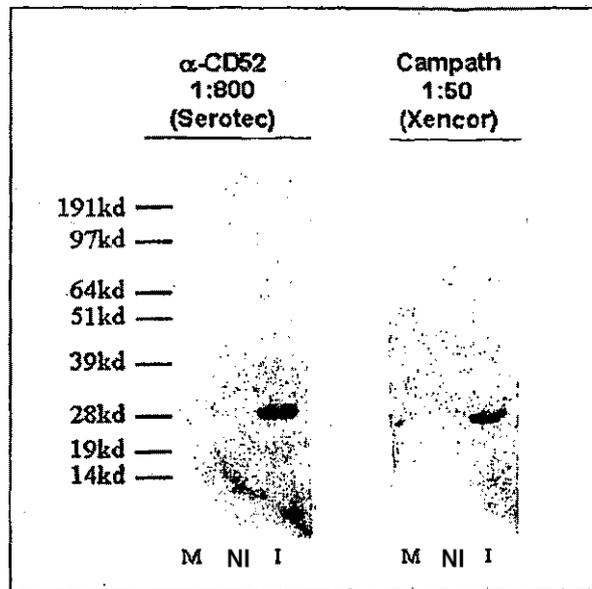


Figura 10

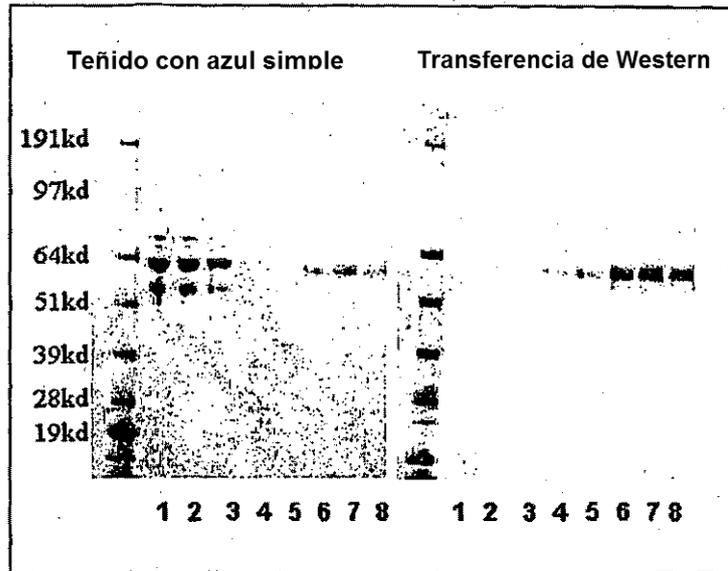


Figura 11

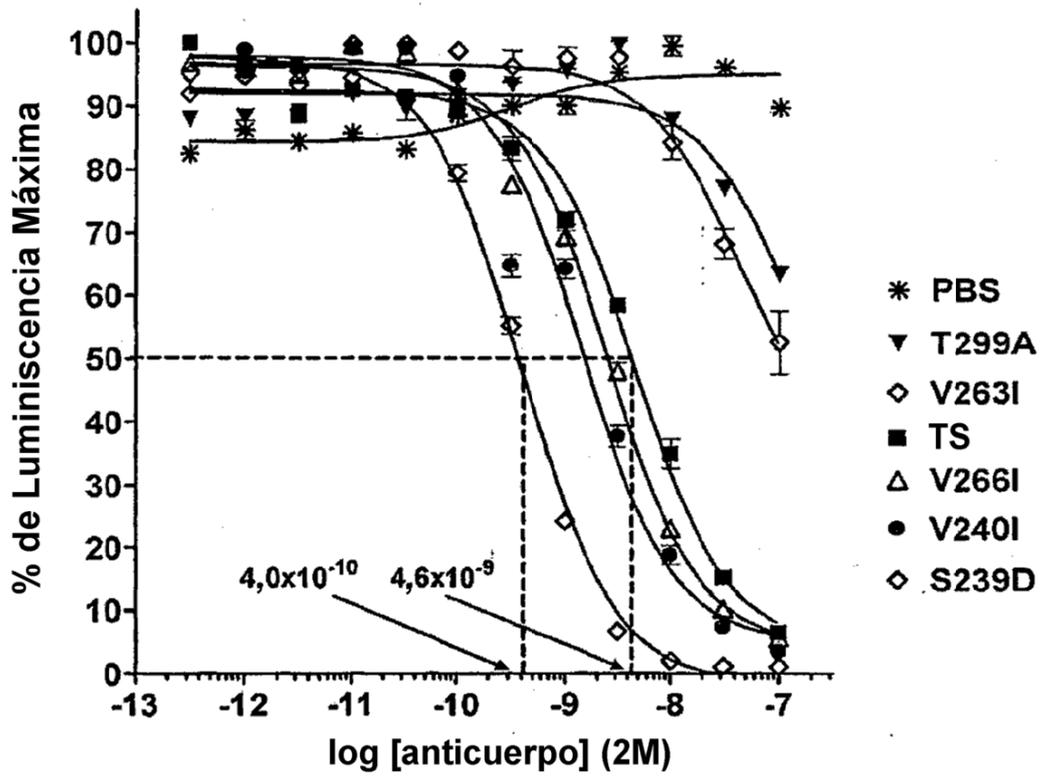


Figura 12

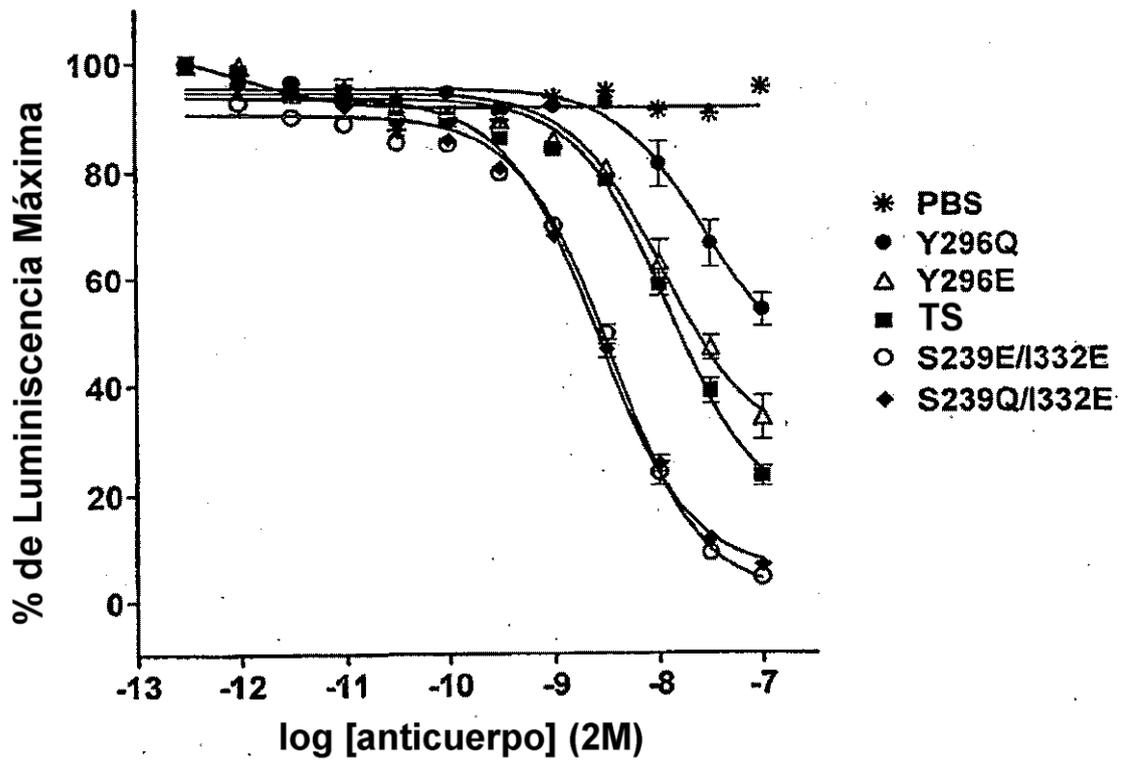


Figura 13

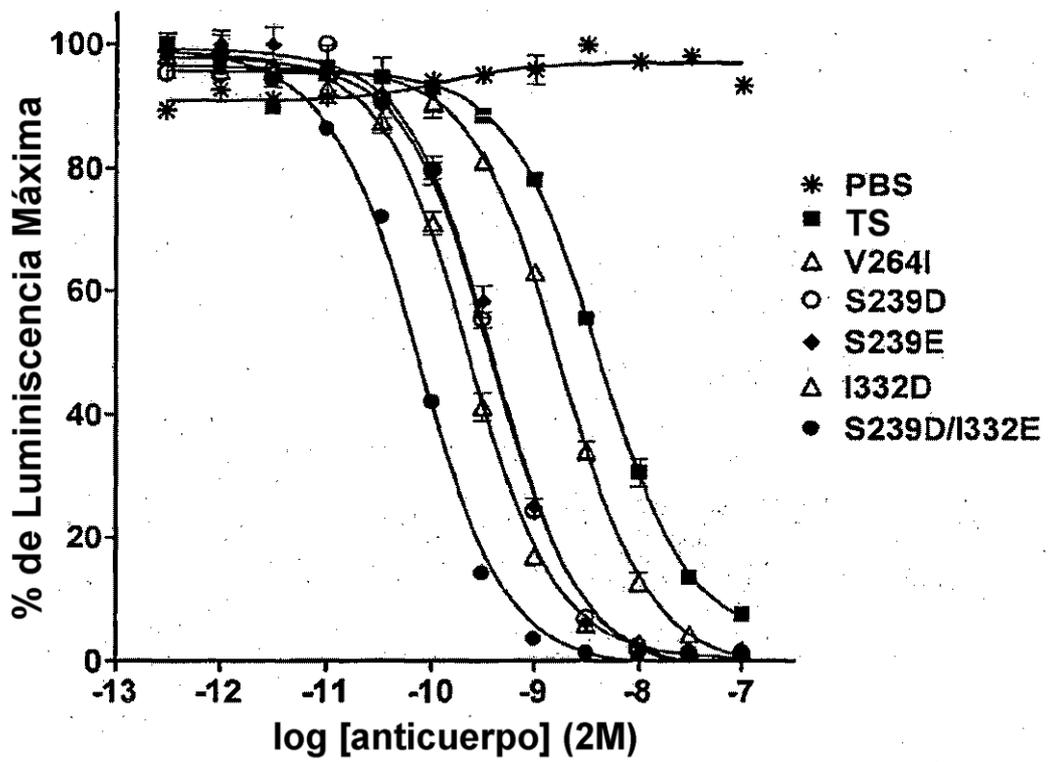


Figura 14

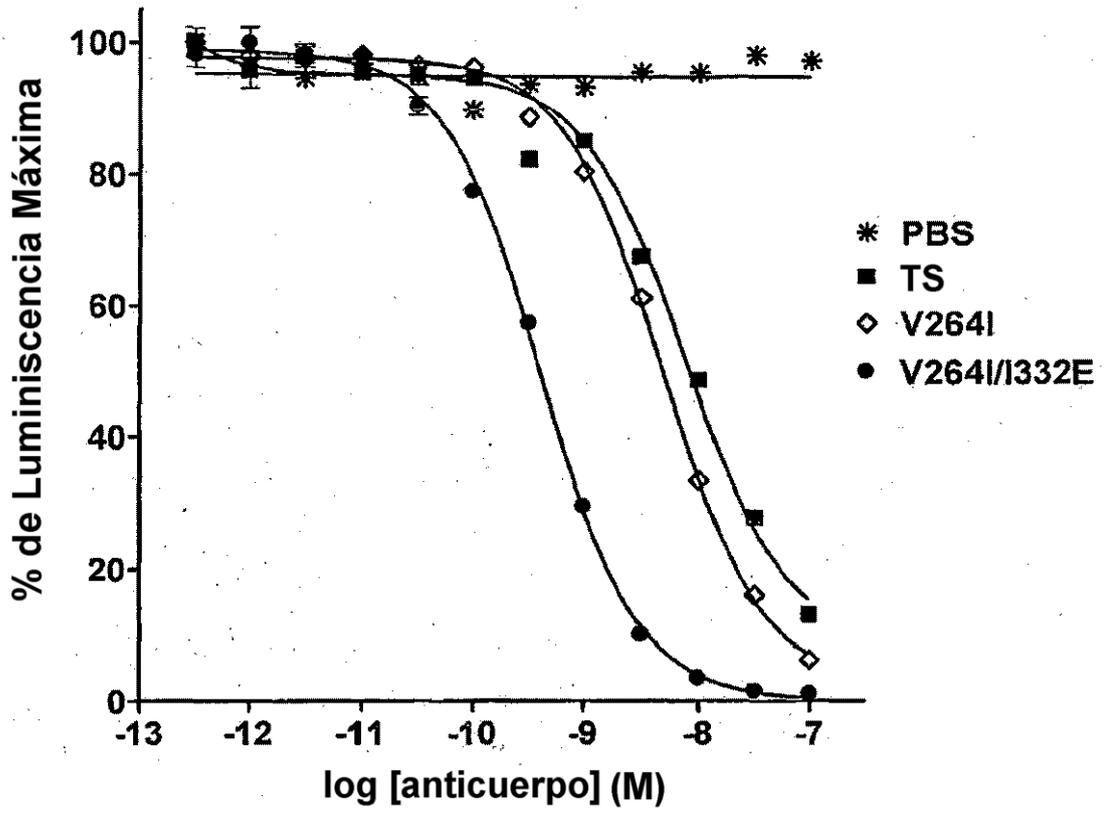


Figura 15

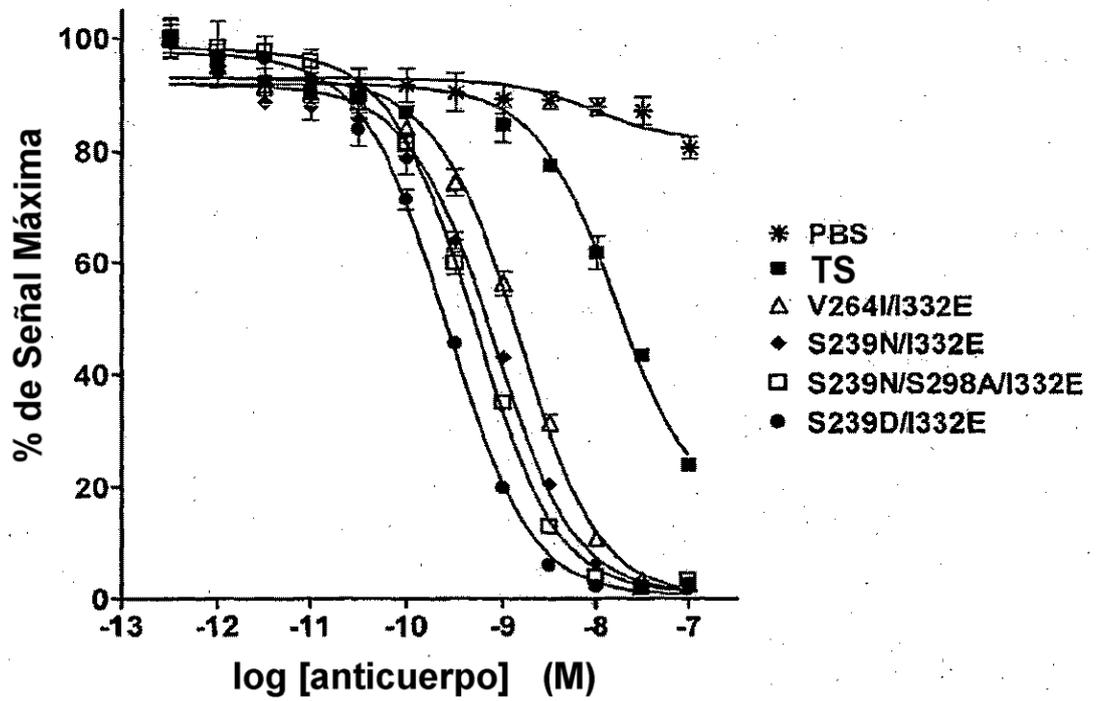


Figura 16a

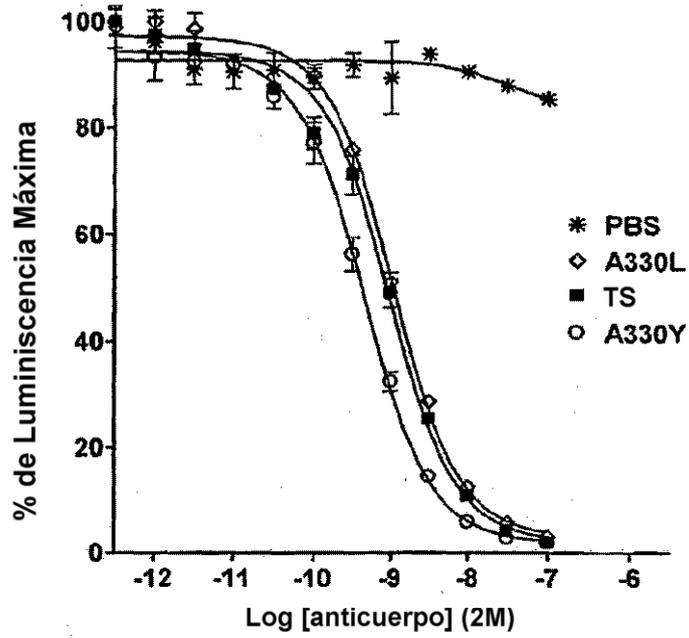


Figura 16b

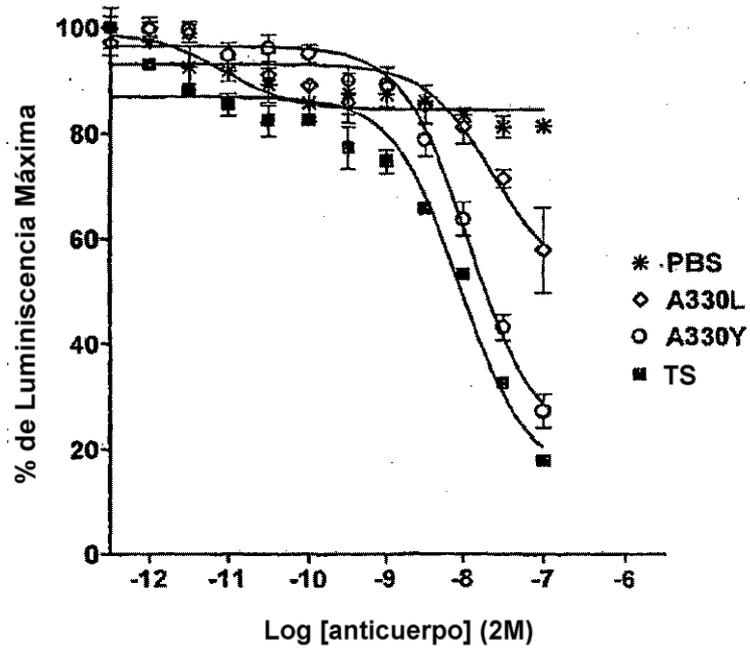


Figura 17

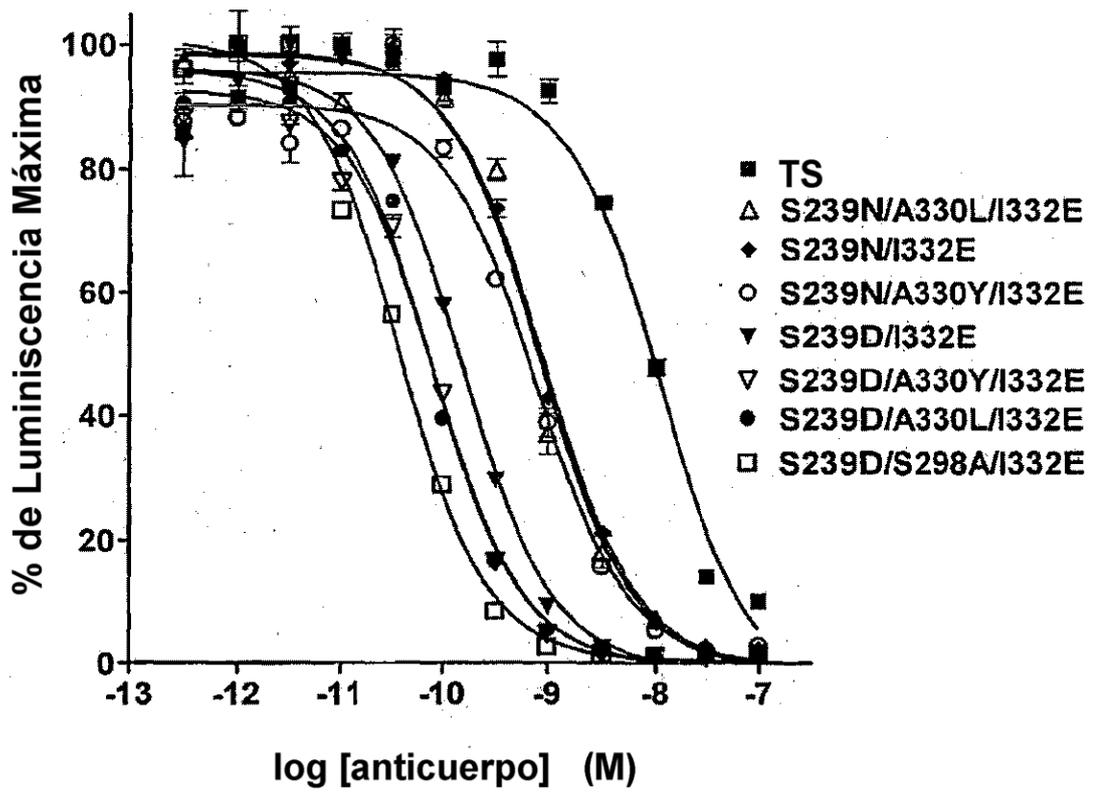


Figura 18

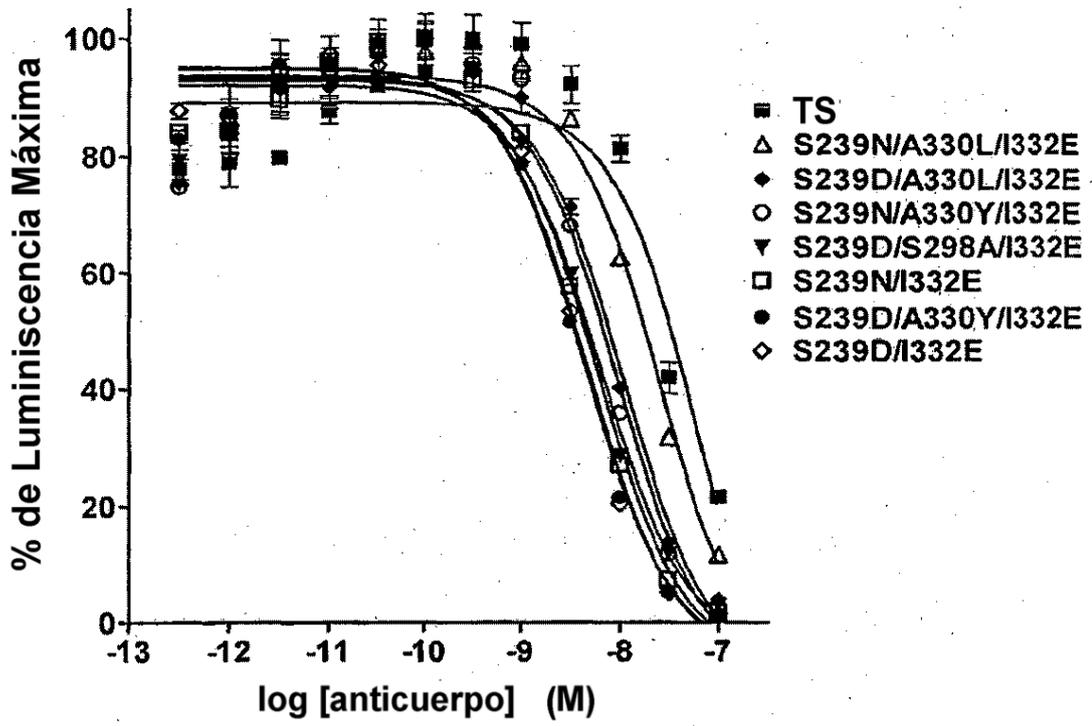


Figura 19a

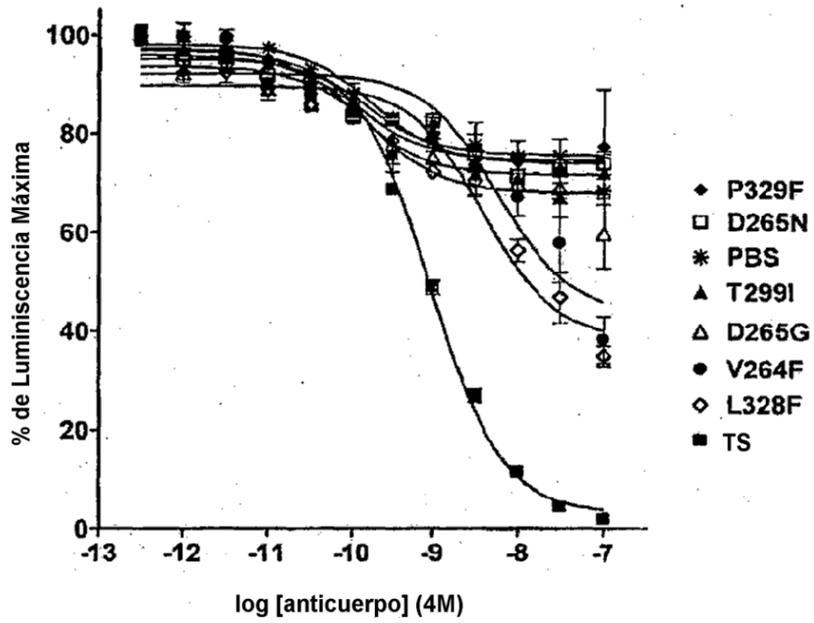


Figura 19b

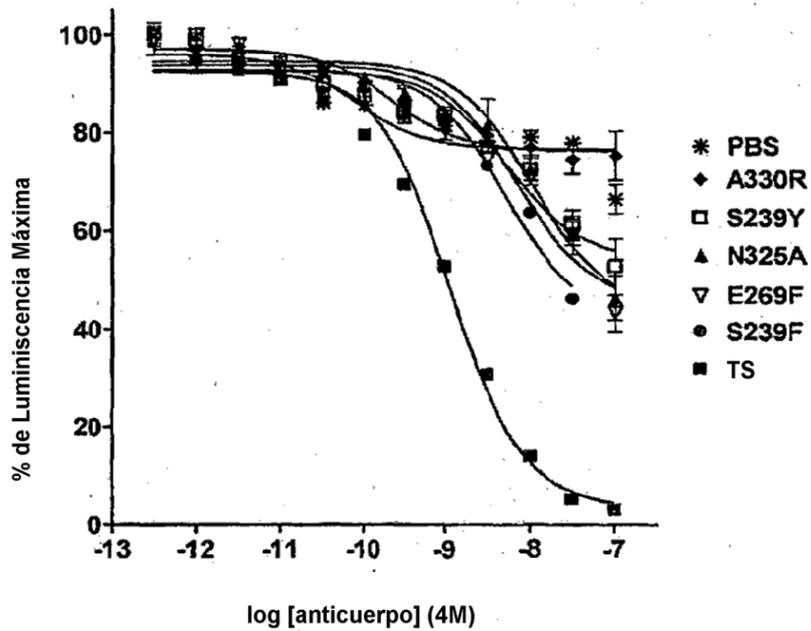


Figura 20

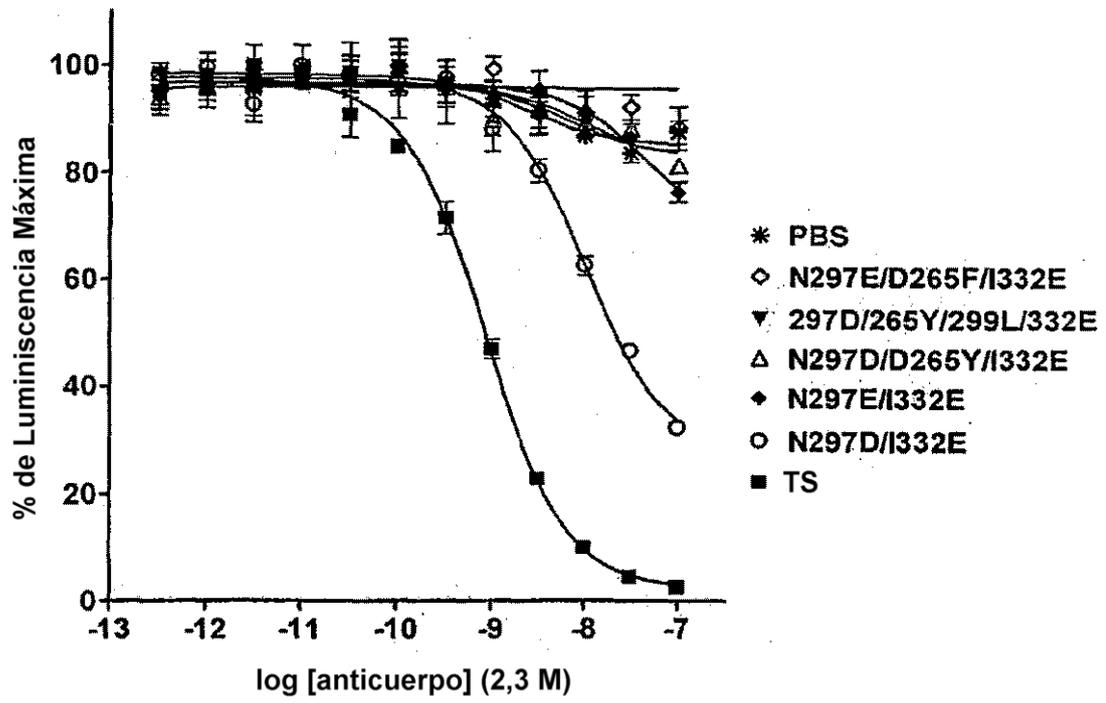


Figura 21

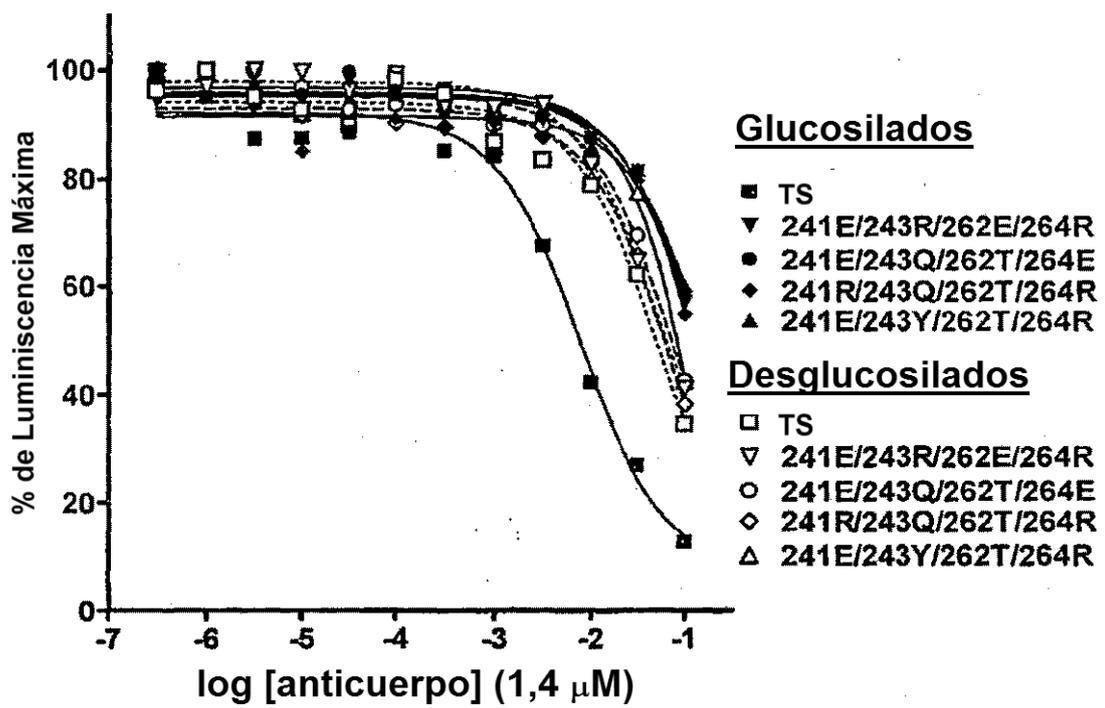


Figura 22a

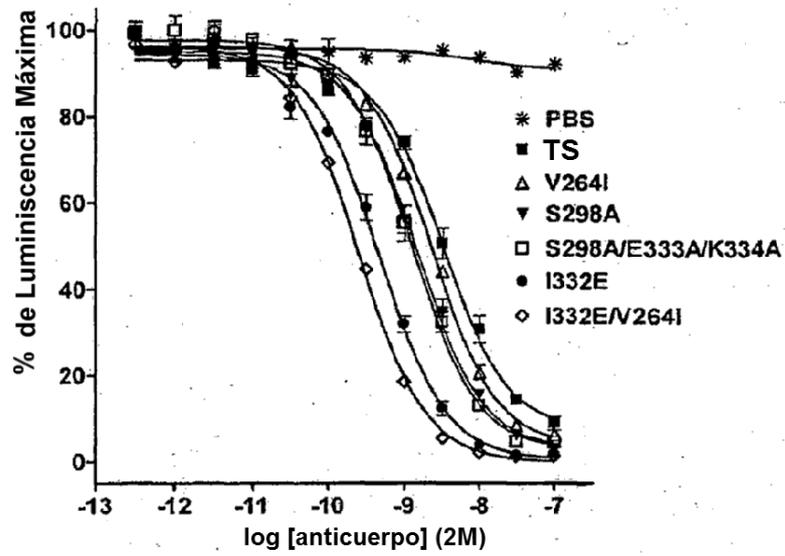


Figura 22b

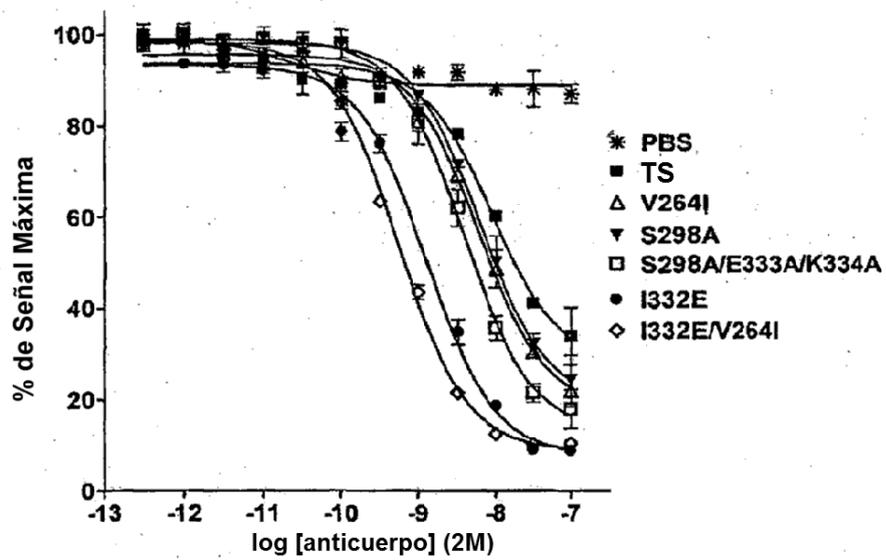


Figura 23a

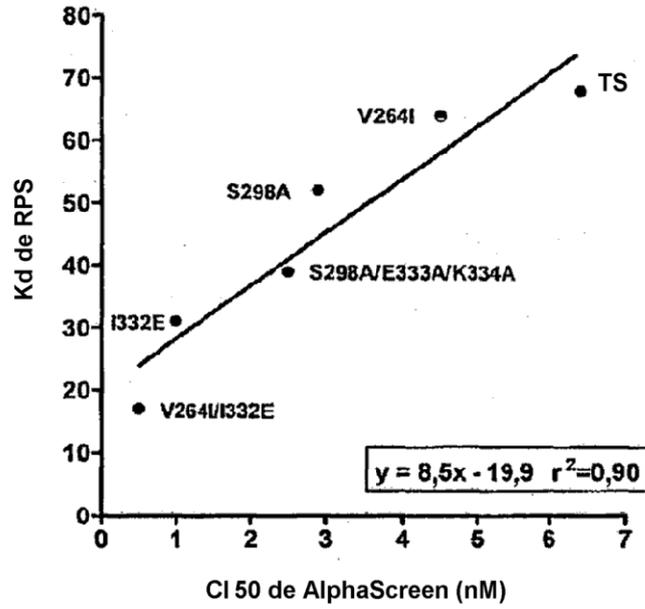


Figura 23b

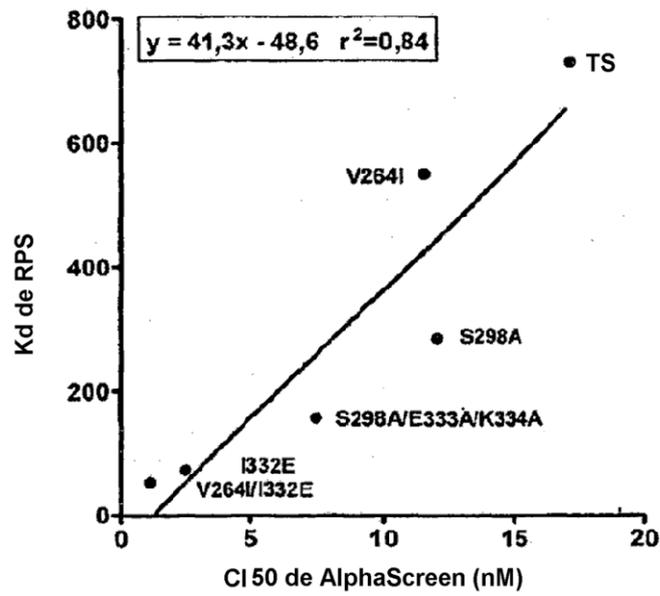


Figura 23c

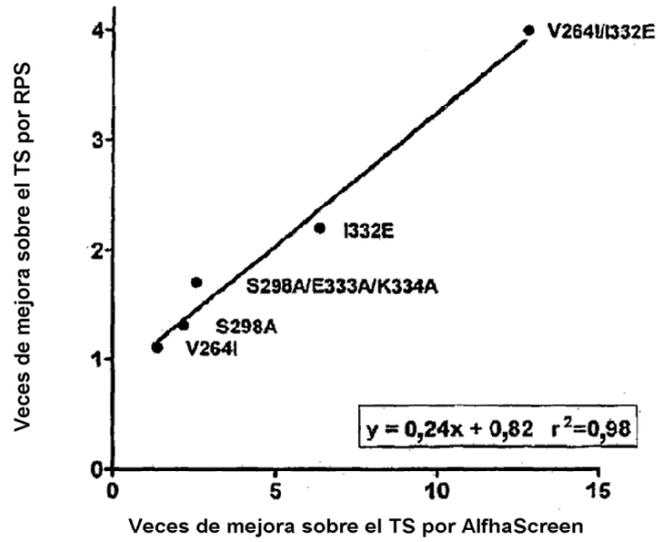


Figura 23d

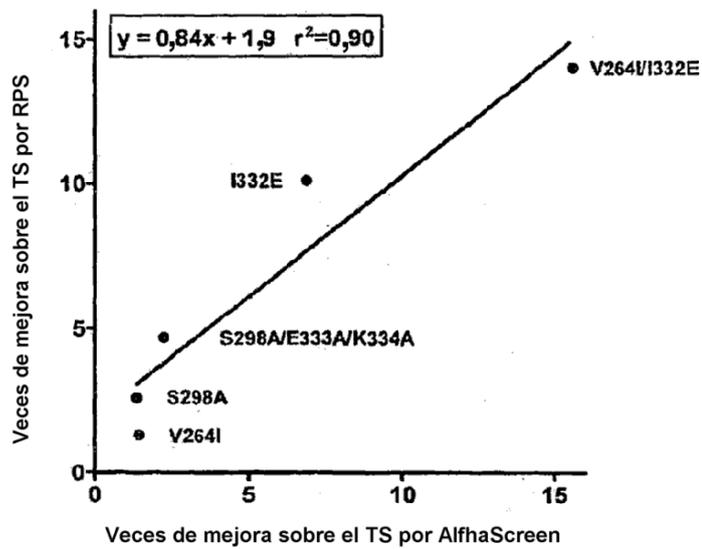


Figura 24a

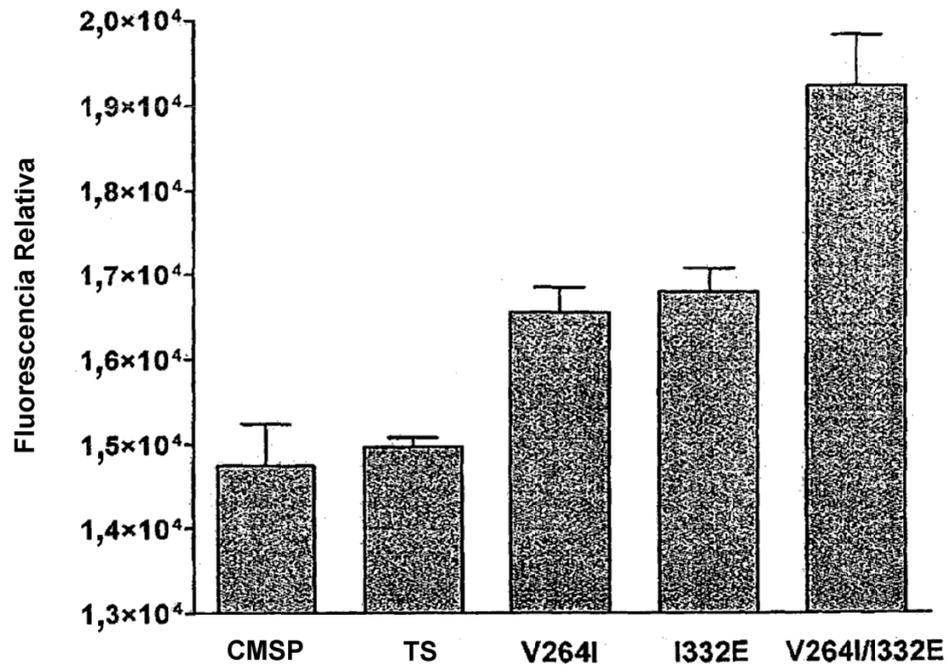


Figura 24b

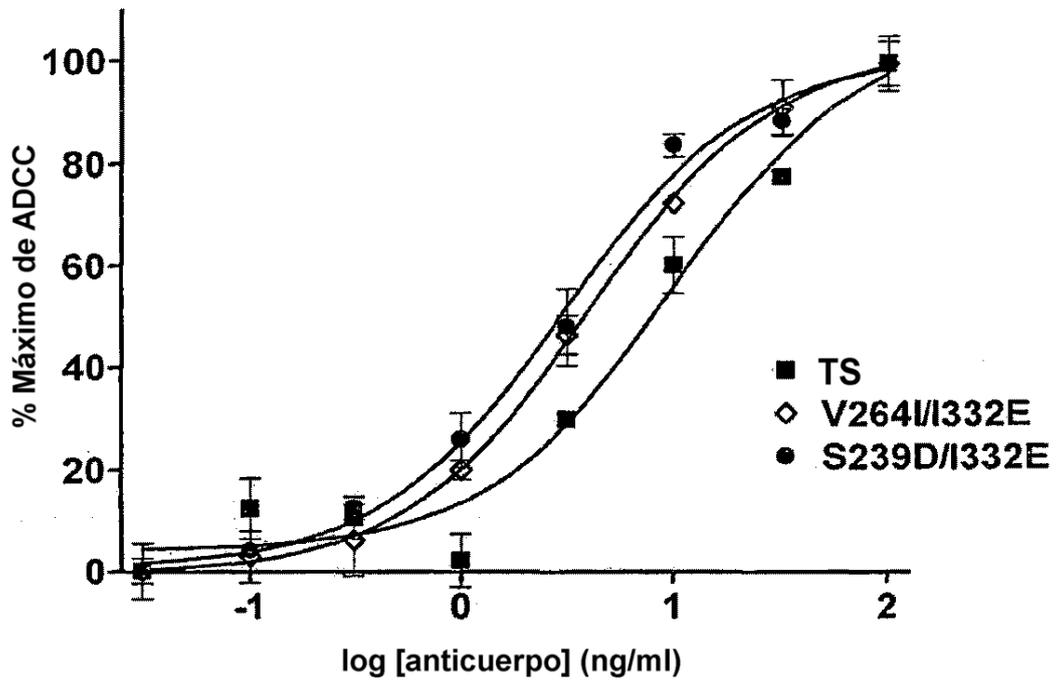


Figura 25a

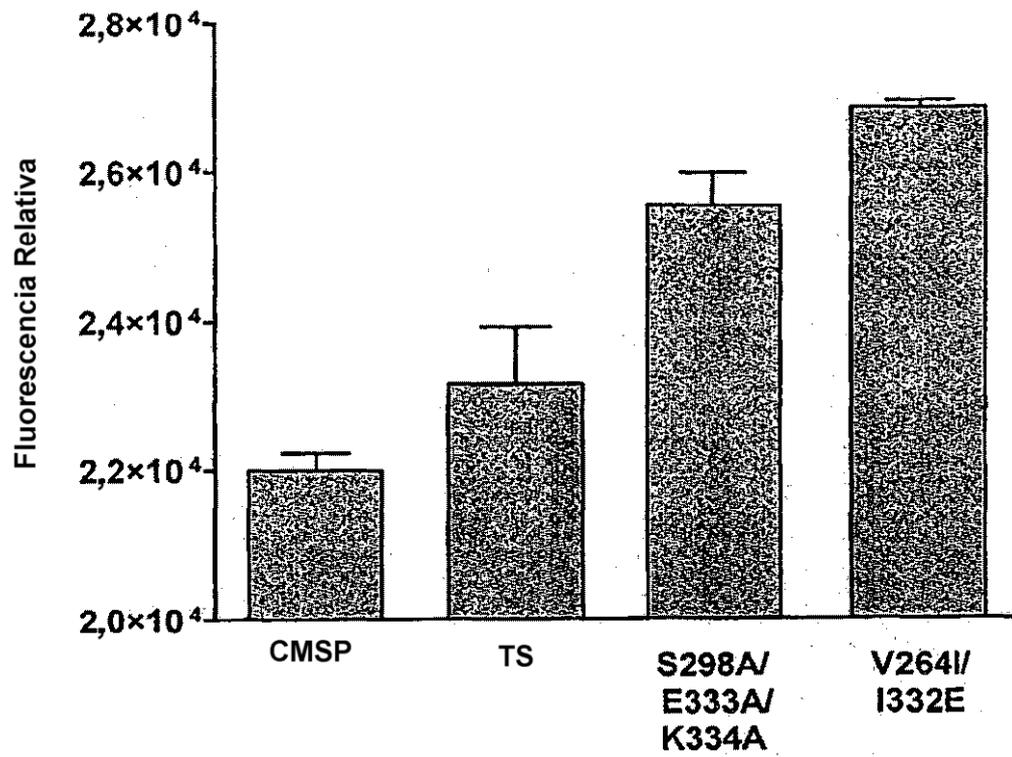


Figura 25b

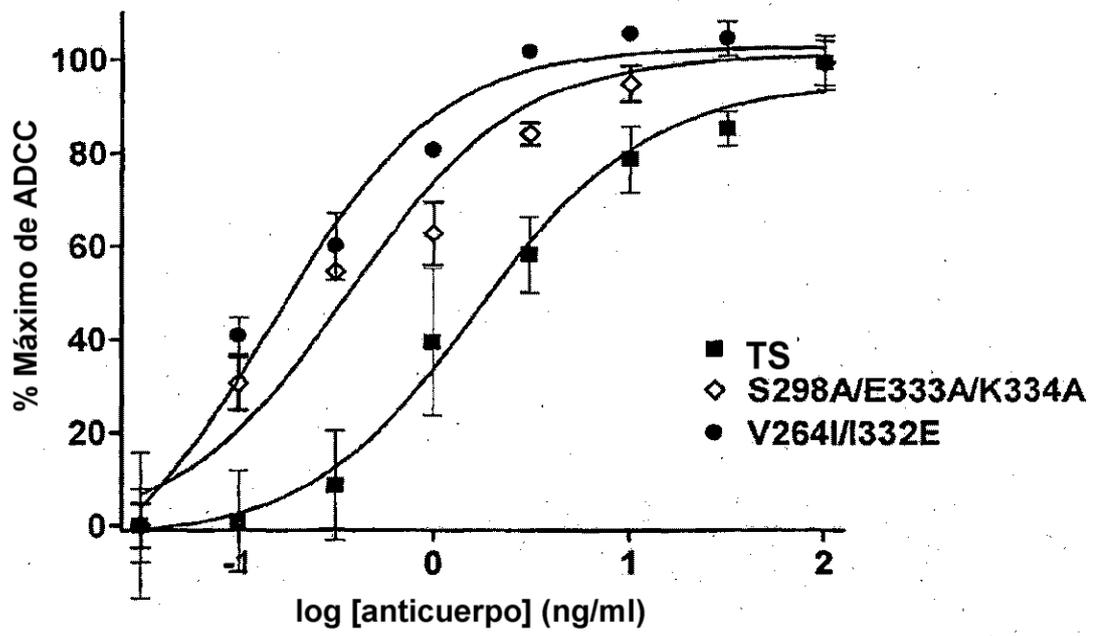


Figura 26a

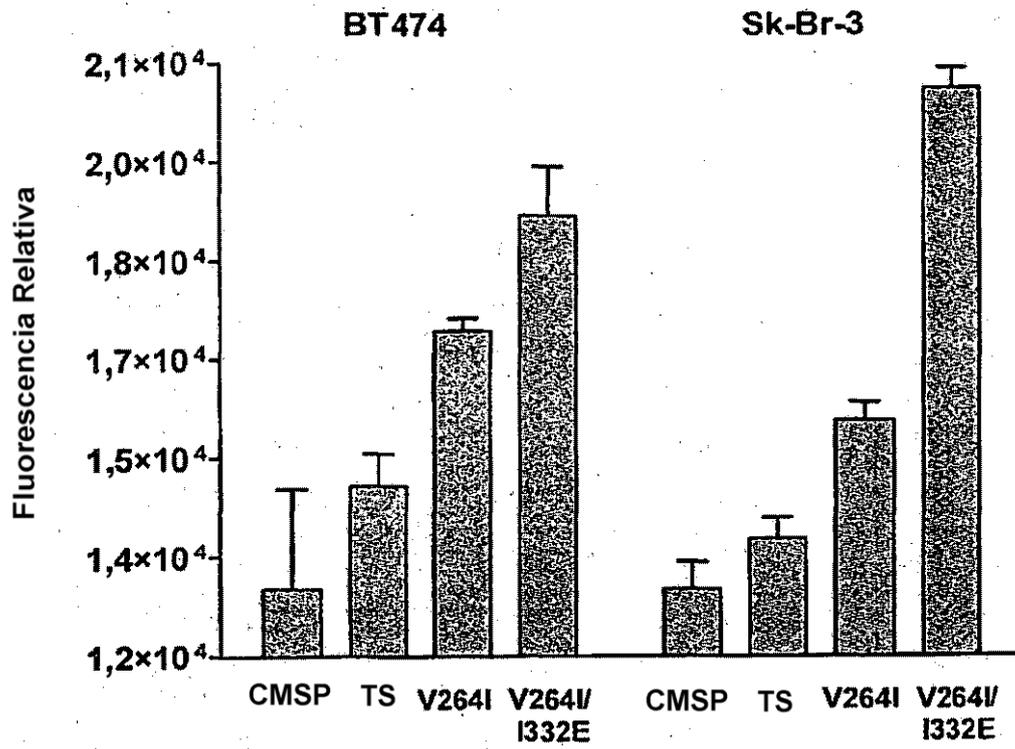


Figura 26b

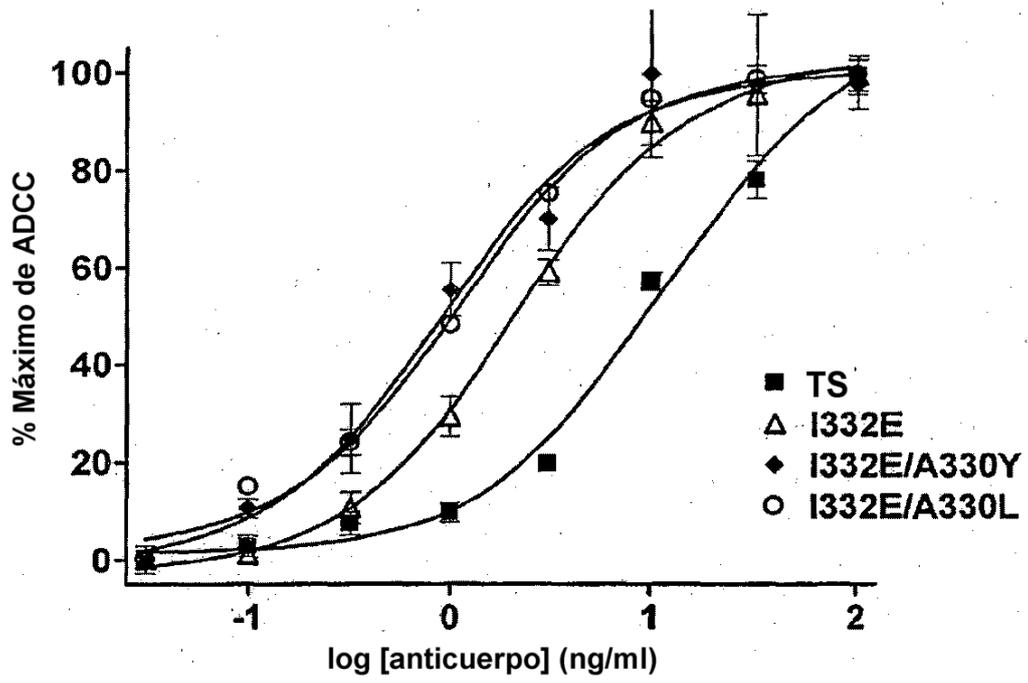


Figura 26c

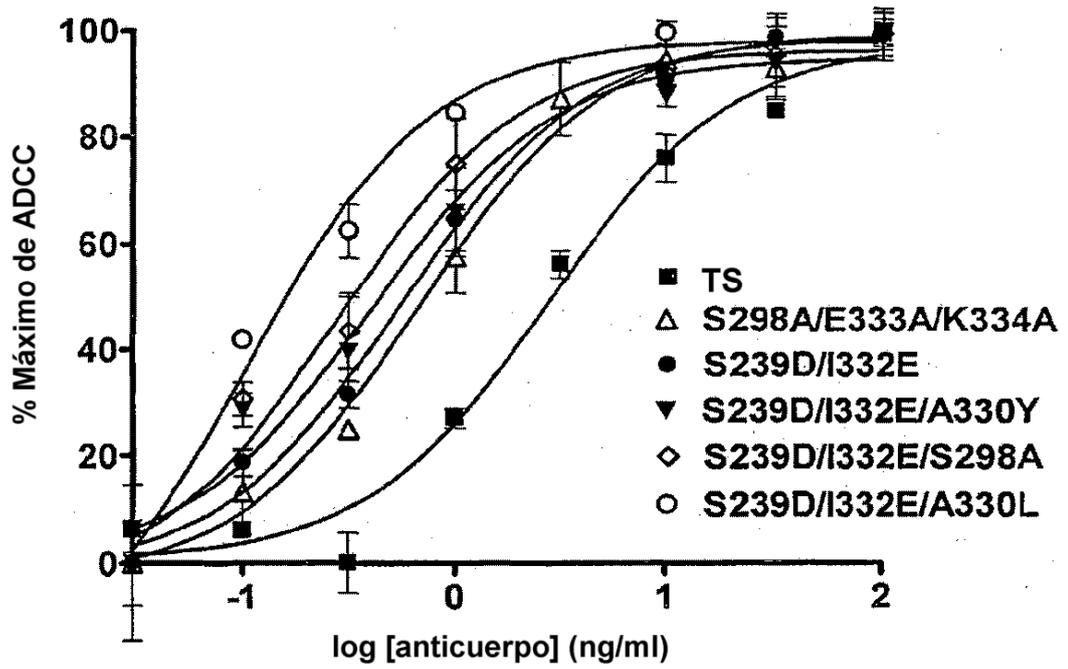


Figura 27a

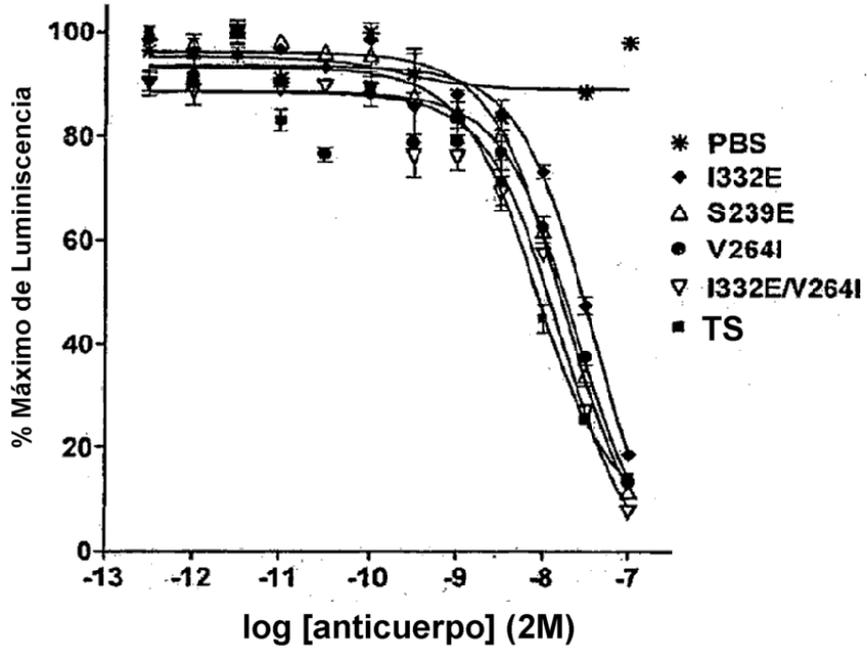


Figura 27b

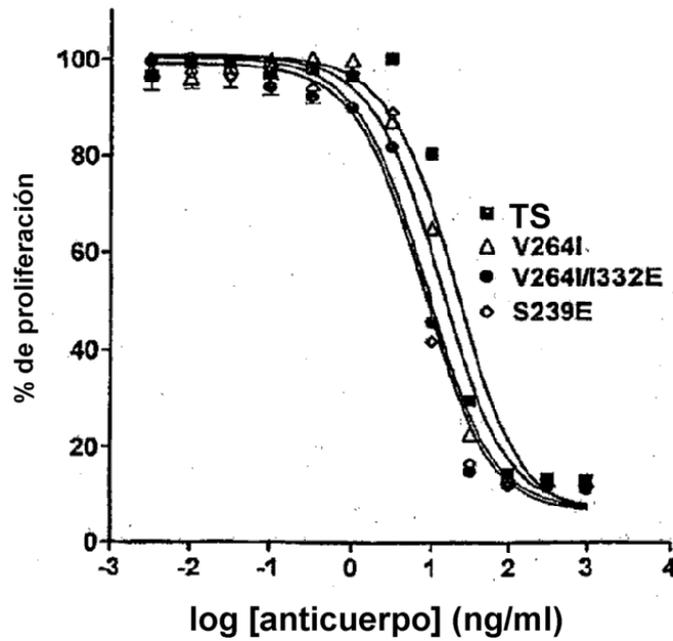


Figura 28

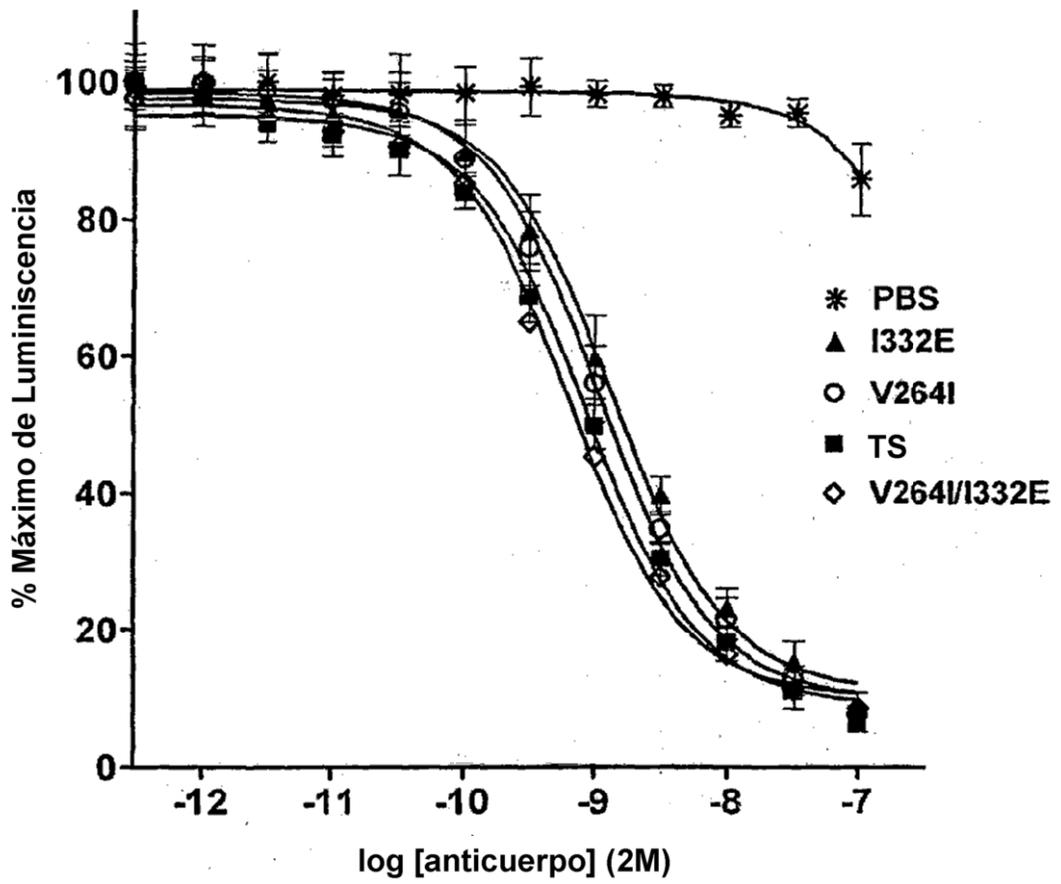


Figura 29

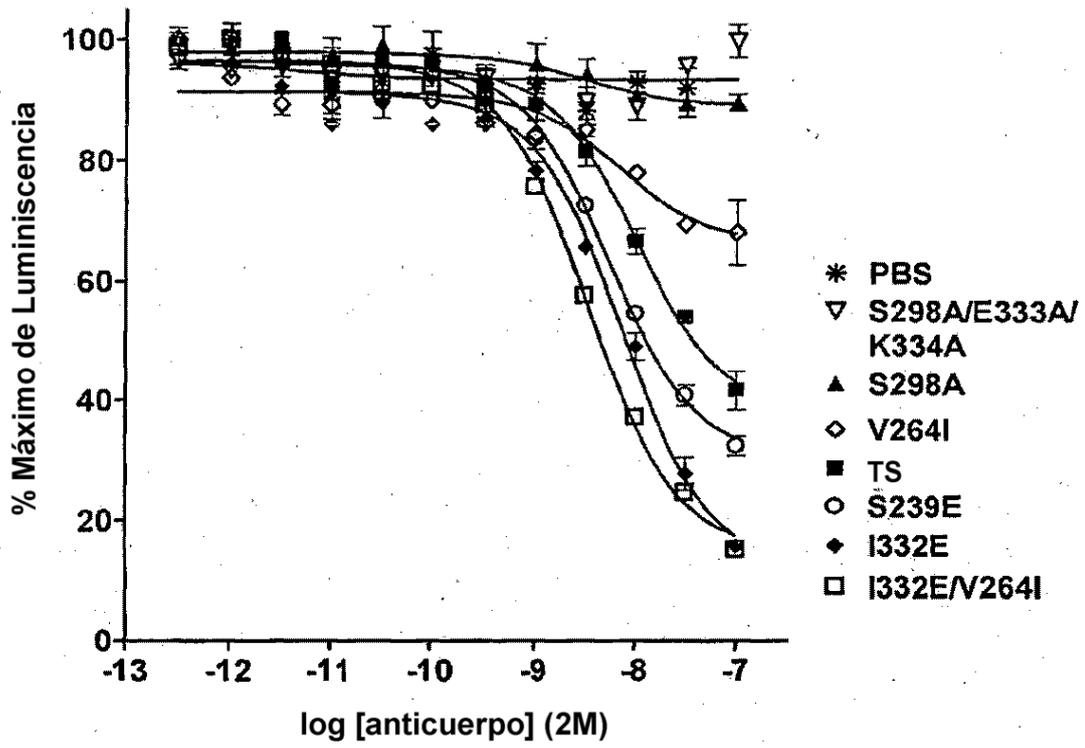


Figura 30

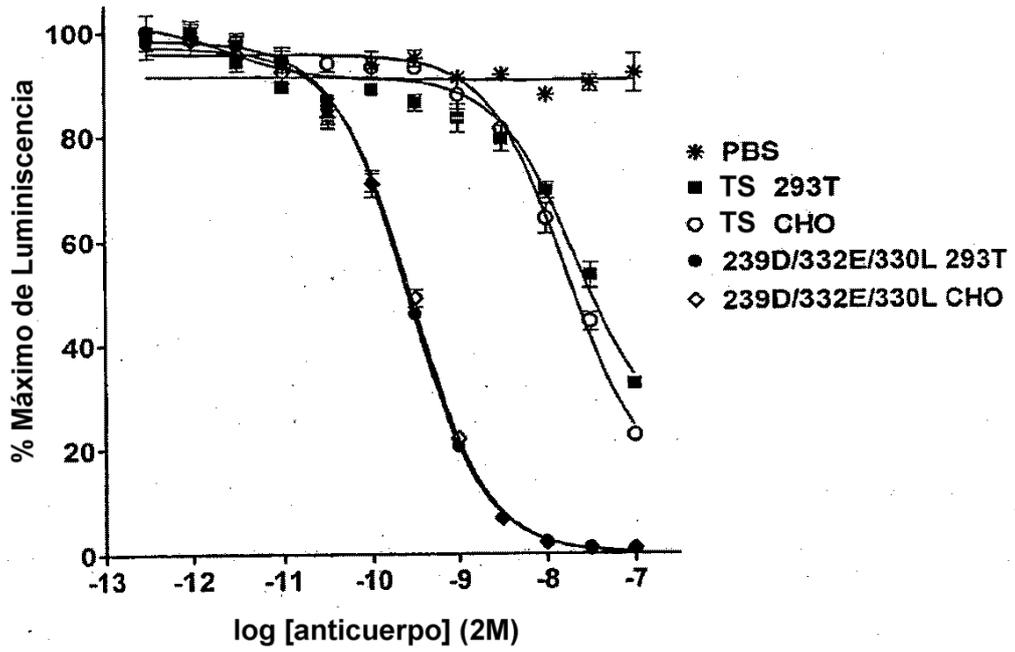


Figura 31a

Cadena ligera anti-CD20

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWYIATSNLASGVPVRFSGSGSG
 TSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLL
 NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
 SPVTKSFNRGEC

Figura 31b

Cadena pesada anti-CD20

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
 YVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 31c

Cadena pesada anti-CD20 que comprende posibles variantes de Fc

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFK
 GKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNWVGAGTTVTVSAASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG
 TQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPX₁X₂FLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVX₃DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYX₄Z₅TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPX₆PX₆EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

POSICIÓN	TS	SUSTITUCIONES POSIBLES
X ₁	S	D, E, N, Q, T
X ₂	V	I, M
X ₃	V	I, T, Y
X ₄	N	D
X ₅	A	Y, L, I
X ₆	I	D, E, N, Q
Z ₁	S	A